

Odivaldo Cambraia Alves

# Desnaturação térmica de hemoglobina por RPE

Tese de Mestrado

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro

Março de 1991

# Agradecimentos

- À Eliane Wajnberg, por todas as orientações e apoio durante a realização deste trabalho.
- À Rosane Charlab, pelas sugestões e preparação das amostras desidratadas.
- À Elena Mavropoulos pela ajuda na preparação das amostras.
- À Alexandre Melo, pela construção do evaporador de  $N_2$ .
- À Darci Esquivel, Lea El-Jaick e Paulo Bish, pelo empréstimo dos micros.
- À minha família e aos amigos, pelo apoio e estímulo.
- À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

# Resumo

O processo de desnaturação de metaHb (tampão fosfato de potássio, pH 7 e força iônica 0,15) e NOHb na forma R tratadas termicamente a 60°C, 70°C e 80°C são estudados por RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica) em função do tempo de desnaturação.

Os espectros de metaHb apresentam o sinal de spin alto devido ao íon  $Fe^{3+}$  estado de spin 5/2, característico da forma nativa, e os sinais de spin baixo ( $Fe^{3+}$  e  $S=1/2$ ) associados à ocupação do 5º e 6º sítio do ferro por átomos da própria globina.

O comportamento da área do sinal de spin alto, spin baixo e total indica que o processo de desnaturação ocorre em etapas com o tempo de transição que diminui com o aumento da temperatura.

As espécies que aparecem foram separadas e as suas proporções em cada espectro da séries do tratamento definidas, e conseqüentemente a provável seqüência de reações do processo é obtida.

O comportamento observado depende da presença de água. As variações dos espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente nas mesmas temperaturas são pequenas e devidas à passagem para um estado com grau de hidratação menor.

A importância da globina no processo é determinada pelo estudo do tratamento da hematina, que não apresenta nenhuma variação no sinal de RPE.

Para NOHb o processo pode ser separado em duas fases, sendo que a primeira está associada ao aumento no número de moléculas de NO ligadas ao ferro.

O espectro da segunda fase apresenta características (sinal em  $g = 2,07$  e triplete hiperfino com centro em 2,011) que devem estar associadas ao aumento ou mesmo rompimento da ligação entre a histidina proximal e o átomo de ferro.

As espécies que compõe os espectros da série do tratamento foram determinadas e a variação de suas proporções em função do tempo de tratamento permite definir um tempo de transição aproximadamente igual ao obtido pela análise da forma e da área do sinal.

Os dois complexos de hemoglobina estudados mostram a importância da ligação com histidina para estabilidade do processo.

# Sumário

Resumo . . . . .	iii
Lista de Figuras . . . . .	viii
Lista de Tabelas . . . . .	xii
<b>Introdução</b>	<b>13</b>
<b>1 Hemoglobina</b>	<b>16</b>
1.1 Introdução . . . . .	16
1.2 Metahemoglobina e hidroxihemoglobina . . . . .	23
1.3 Hemicromos . . . . .	24
<b>2 Ressonância paramagnética eletrônica</b>	<b>27</b>
2.1 Condição de ressonância e valor de $g$ . . . . .	27
2.2 Dependência do sinal de RPE com a temperatura . . . . .	31
2.3 Modulação . . . . .	32
2.4 Ion $Fe$ em hemoproteínas . . . . .	33
2.4.1 Teoria de campos ligantes . . . . .	33
2.4.2 Spin alto: $S = 5/2$ . . . . .	35

2.4.3	Spin baixo $S = 1/2$ . . . . .	39
2.5	Nitrosilhemoglobina (NOHb) . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Desnaturação de proteínas</b>	<b>48</b>
3.1	Estado nativo . . . . .	48
3.2	Estado desnaturado . . . . .	50
3.3	Transição do estado nativo para o estado desnaturado . . . . .	51
3.3.1	Transição sem estados intermediários . . . . .	51
3.3.2	Transição com estados intermediários . . . . .	53
3.4	Desnaturação de hemoglobina . . . . .	54
3.4.1	Desnaturação térmica . . . . .	54
3.4.2	Desnaturação por variação de pH . . . . .	55
3.4.3	Desnaturação por solventes orgânicos e sais inorgânicos . . . . .	57
3.4.4	Desnaturação por detergentes . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>61</b>
4.1	Preparação de amostras . . . . .	61
4.2	Técnica experimental . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>67</b>
5.1	Metahemoglobina . . . . .	67
5.2	Metahemoglobina desidratada . . . . .	84
5.3	Hematina . . . . .	91

5.4 Nitrosilhemoglobina . . . . .	95
<b>6 Conclusões</b>	<b>108</b>
6.1 Metahemoglobina . . . . .	108
6.2 Nitrosilhemoglobina . . . . .	114
6.3 Sugestões para continuidade dos estudos . . . . .	116
<b>Apêndice A</b>	<b>120</b>
Bibliografia . . . . .	121

# Lista de Figuras

1.1	Grupo heme . . . . .	17
1.2	Grupo heme e as histidinas distal e proximal. A esfera representa a posição do 6º ligante . . . . .	18
1.3	As cadeias $\alpha$ e $\beta$ da hemoglobina . . . . .	19
1.4	Curvas de saturação . . . . .	20
1.5	Esquema da estrutura na vizinhança de alguns dos hemicromos . . . . .	26
2.1	Efeito do campo ligante no orbital $3d$ . a)életron $d$ simples b)spin alto c)spin baixo . . . . .	35
2.2	Níveis de energia de um íon com $S = 5/2$ em um campo magnético. As setas indicam a região onde a diferença de energia é da ordem da energia típica de espectrômetros de banda-X. . . . .	36
2.3	Populações dos dubletos em função da temperatura . . . . .	37
2.4	Espectros de hemoproteínas com spin alto a)simetria tetragonal b)simetria tetragonal e distorção rômbrica . . . . .	39
2.5	Espectros de RPE de ferrihemoproteínas com spin baixo . . . . .	40
2.6	Orbital $t_{2g}^5$ em diferentes condições de campo cristalino . . . . .	41



2.7	Espectros de NOHb no estado T, mostrando a constante de acoplamento hiperfino A. . . . .	44
2.8	Estrutura eletrônica do modelo $\sigma^*$ . . . . .	47
3.1	Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos . . . . .	49
3.2	Temperaturas de transição . . . . .	57
3.3	Espectros de RPE de NOHb desnaturada por detergentes . . . . .	60
4.1	Resultado da correção da linha de base e intervalo do campo magnético onde são calculadas as áreas. . . . .	65
5.1	Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 60°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho:2000 . . . . .	68
5.2	Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 70°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 2000 . . . . .	69
5.3	Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 2000 . . . . .	70
5.4	Variação das áreas dos sinais de solução de metaHb a)spin alto b)spin baixo c)área total . . . . .	72
5.5	MetaHb desnaturadas termicamente a $T = 70^\circ\text{C}$ e $t = t_x$ sem NEM (a) ou com NEM (b) e a $T = 80^\circ\text{C}$ e $t = 3,5h$ sem NEM (c) ou com NEM (d). 76	
5.6	Espécies que aparecem durante a desnaturação térmica de solução de metaHb. Áreas normalizadas . . . . .	78

5.7	Comparação entre os espectros experimentais e obtidos pela combinação dos espectros das três espécies (A, B e C). Áreas normalizadas . . . . .	80
5.8	Variação das proporções de cada espécie (A, B e C) durante a desnaturação para diferentes temperaturas de tratamento térmico. . . . .	82
5.9	Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 60°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200 . . . . .	85
5.10	Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 70°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200 . . . . .	86
5.11	Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 80°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200 . . . . .	87
5.12	Variação das áreas dos sinais de metaHb desidratada a)spin alto b)hemicromos c)área total . . . . .	89
5.13	Hematina . . . . .	91
5.14	Espectros de RPE de hematina tratada termicamente a 70°C com tempos de tratamentos diferentes. Ganho: 20 . . . . .	92
5.15	Espectros de RPE hematina tratada termicamente a 80°C com tempos de tratamentos diferentes. Ganho: 20 . . . . .	93
5.16	Variação da area do sinal de RPE de hematina tratada termicamente . .	94
5.17	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 60°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63. . . . .	96
5.18	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 70°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63 . . . . .	97

5.19	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63 . . . . .	98
5.20	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 60°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a $\simeq$ 2300 G. . . . .	99
5.21	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 70°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a $\simeq$ 2300 G. . . . .	100
5.22	Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 80°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a $\simeq$ 2300 G. . . . .	101
5.23	Área do sinal de NOHb . . . . .	103
5.24	Comparação dos espectros obtidos como combinação dos espectros inicial ( $A^{NO}$ ) e final ( $B^{NO}$ ) da desnaturação com experimentais. Áreas normalizadas. . . . .	105
5.25	Proporções de cada especie de NOHb . . . . .	107
6.1	comparação entre o espectro experimental de metaHb desidratada e o obtido como combinação das espécies B e C. . . . .	110

# Lista de Tabelas

1.1	Alguns ligantes que podem ocupar a 6 <sup>a</sup> coordenação do ferro da heme e o efeito sobre a valência e o estado de spin do ferro . . . . .	23
-----	--	----

# Introdução

As hemoproteínas têm como funções biológicas o armazenamento e transporte de oxigênio através dos organismos (hemoglobina, Hb, e mioglobina), e o transporte de elétrons durante a respiração (citocromos). Para a ligação ou dissociação da molécula de oxigênio a proteína altera sua conformação e o estado de spin do ferro do centro ativo (heme).

A presença de um átomo de ferro na heme, que é um metal com as propriedades magnéticas bem conhecidas, permite a utilização de várias técnicas físicas no estudo das hemoproteínas.

O estudo do processo de desnaturação das proteínas, através do qual a molécula perde sua função, é importante na compreensão das forças que estabilizam as moléculas na sua conformação nativa.

O estudo por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) da desnaturação térmica de oxiHb e metaHb, com tempos fixos e variando a temperatura, indica que o processo ocorre em etapas, onde cada etapa pode estar relacionada à mudança dos ligantes do ferro da heme [1].

Posteriormente as mudanças nos espectros de absorção ótica mostraram que espon-

taneamente, ou sob ação de desnaturantes tais como uréia e salicicato, a oxiHb passa para o estado de metaHb. Esta é a primeira da série de reações que constituem o processo de desnaturação. As reações posteriores são devidas às alterações da globina, de modo que o 5º e o 6º sítios de ligação do ferro passam a ser ocupados por ligantes endógenos (átomos da própria globina) [2].

Por outro lado, os sinais de RPE de NOHb em diferentes concentrações de detergentes mostram alterações semelhantes as observadas durante a transição entre as formas T e R da proteína. Estas mudanças no sinal foram consideradas como sendo características da desnaturação causada pela interação entre as moléculas da proteína e dos detergentes [3].

O objetivo deste trabalho é estudar, usando RPE, o processo de desnaturação térmica a temperaturas fixas e variando o tempo de tratamento de metaHb e NOHb e então separar as etapas do processo, definir seus tempos de transição e identificar as espécies que são formadas.

Uma descrição da molécula de hemoglobina e seus ligantes e dos hemicromos é mostrada no capítulo 1.

No capítulo 2, apresentamos uma breve revisão da técnica experimental utilizada (RPE) e dos resultados experimentais para Hb.

No capítulo 3, mostramos a teoria de desnaturação, bem como as mudanças nas moléculas de Hb usando vários agentes desnaturantes.

No capítulo 4, damos uma descrição dos procedimentos experimentais: preparação das amostras, condições de medidas e tratamento dos dados. E finalmente, nos capítulos

5 e 6 são mostrados os resultados experimentais e as conclusões.

# Capítulo 1

## Hemoglobina

### 1.1 Introdução

A hemoglobina (Hb), a principal proteína das hemácias, transporta oxigênio dos pulmões através das artérias até os tecidos e ajuda a conduzir o dióxido de carbono através das veias de volta aos pulmões.

A molécula de Hb tem quatro cadeias proteicas iguais duas a duas, chamadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Associados a cada cadeia existe um grupo heme, o centro ativo da proteína: um átomo de ferro circundado por um anel porfirínico ligado a globina através de ligações iônicas com os grupos carboxilatos dos aminoácidos nas posições 6 e 7 (figura 1.1) [4].

Em geral o átomo de ferro têm seis ligantes em uma simetria octaedral. Na Hb quatro ligantes são os átomos de N da própria heme, o 5º é o grupo imidazol da histidina proximal e a 6ª posição corresponde ao sítio de ligação do oxigênio, no caso fisiológico, e que pode também ser ocupado por outras moléculas tais como  $H_2O$ , CO, NO, etc.



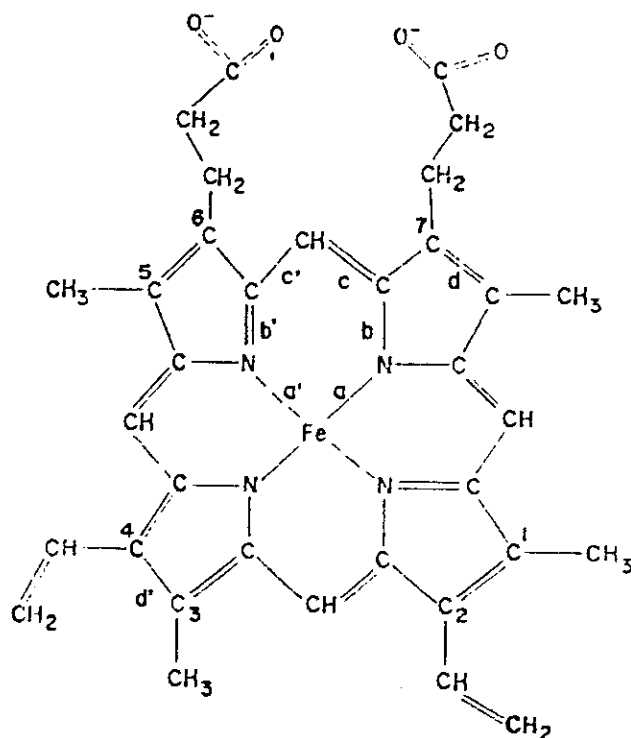


Figura 1.1: Grupo heme

Do outro lado do ligante na 6ª posição existe a histidina distal que está muito distante do ferro para se ligar diretamente a ele, mas faz ponte de hidrogênio com o 6º ligante (figura 1.2).

Cada um dos quatro átomos de ferro da molécula de Hb pode se ligar a uma molécula de oxigênio,  $O_2$ . Esta reação é reversível, uma vez que o oxigênio é absorvido nos pulmões onde a pressão parcial é alta e liberado onde é baixa, como nos tecidos.

A Hb também desempenha papel importante ao trazer o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) dos tecidos para os pulmões. Este gás não é trazido através de ligação com os átomos de ferro, mas apenas parte dele liga-se diretamente à Hb (nas extremidades aminos das cadeias) e a sua maior parte é absorvido pelas hemácias e pelo plasma na forma de bicarbonato. O transporte de bicarbonato é facilitado pelo aparecimento de um grupo

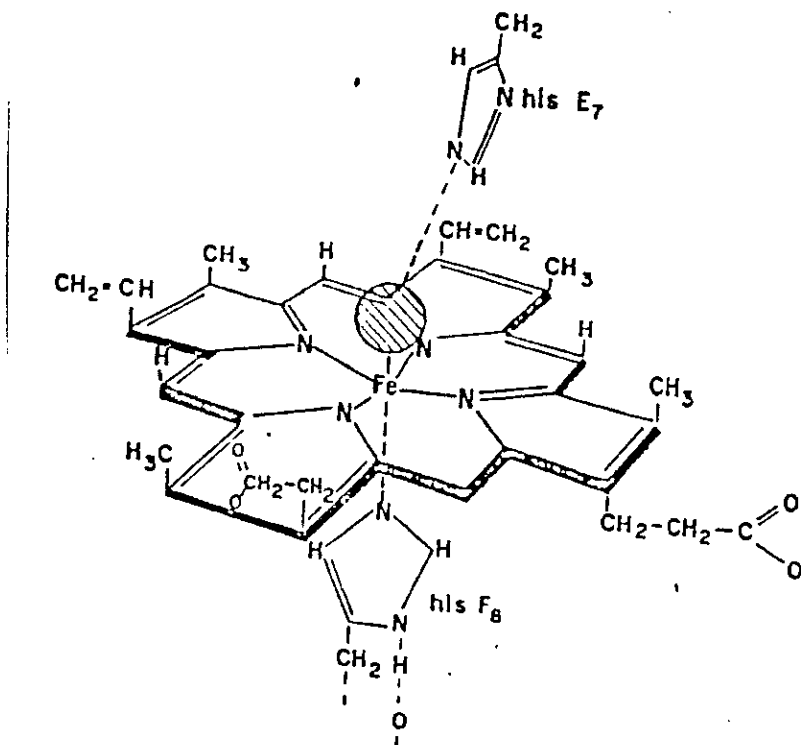


Figura 1.2: Grupo heme e as histidinas distal e proximal. A esfera representa a posição do 6º ligante

ácido na Hb para cada molécula de  $O_2$  liberada. O desaparecimento nos pulmões do grupo ácido, quando o oxigênio é novamente ligado a Hb dá início a uma série de reações que leva ao desligamento do bicarbonato. Reciprocamente a presença de bicarbonatos e ácido láctico nos tecidos acelera a liberação de oxigênio [5].

As cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  assumem uma forma semelhante a uma caixa em torno da heme. As paredes desta caixa são constituídas por oito pedaços de hélices  $\alpha$ , identificadas pelas letras A a H (figura 1.3). A estabilidade da configuração de cada cadeia é determinada principalmente por forças hidrofóbicas.

As quatro cadeias se arranjam em uma molécula quase esférica com dimensões

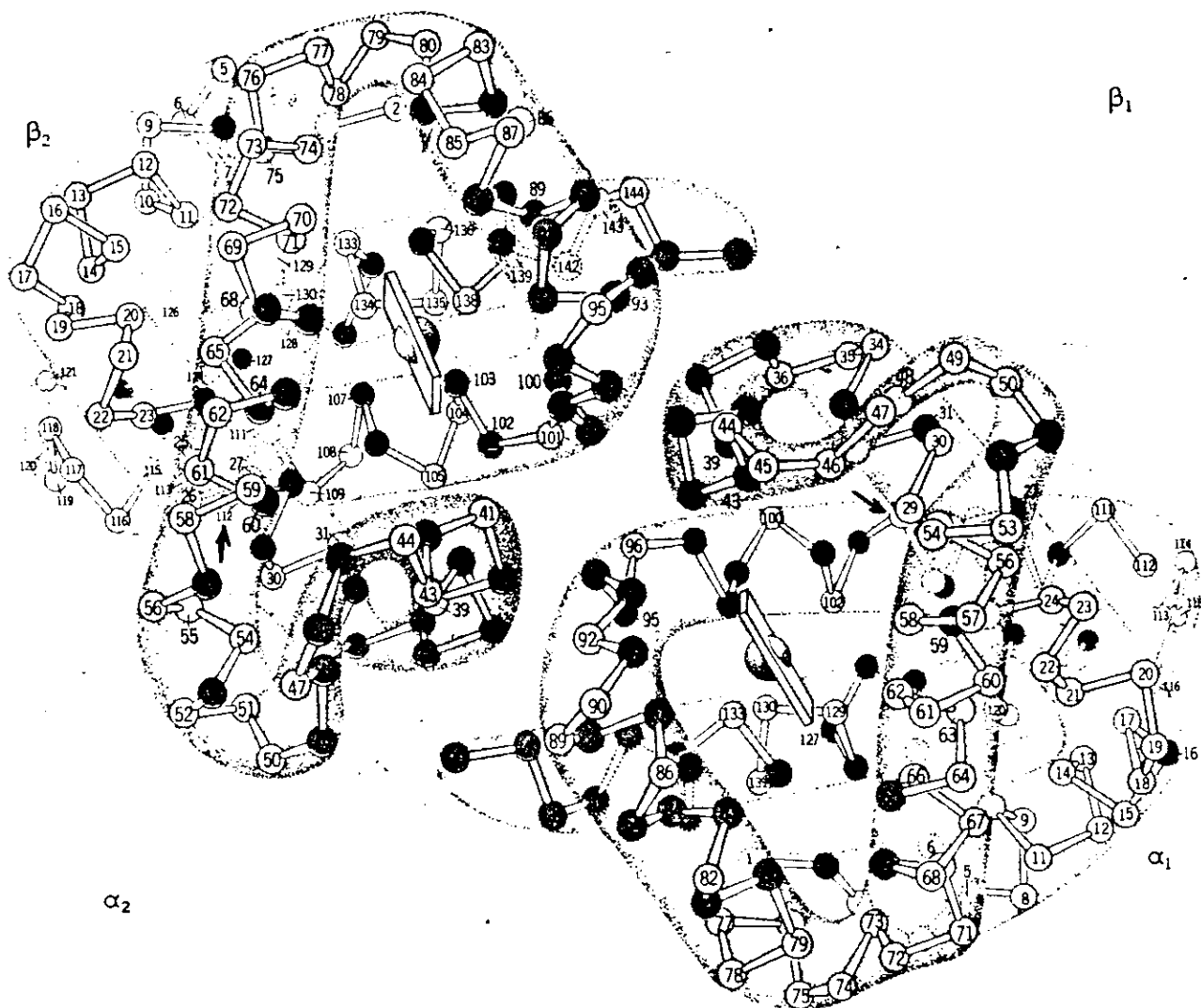


Figura 1.3: As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina

$64 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$ , e agrupadas de modo a existir pouco contato entre cadeias iguais e muito entre cadeias diferentes. Os contatos entre cadeias diferentes são de dois tipos: fixos e que se movem durante a transição da forma desoxi para oxi.

Além do movimento das cadeias, a ligação do oxigênio provoca outras alterações na Hb como por exemplo a mudança no estado de spin do ferro de 2 para 0 e o movimento do átomo de ferro e da histidina proximal em relação ao plano da heme. O átomo de ferro está fora do plano da heme na forma desoxi e é coplanar a heme na forma oxi e a histidina passa de uma inclinação de  $8^\circ$  em relação a normal a heme no estado desoxi para uma posição perpendicular ao plano da heme na forma oxi.

Uma outra característica importante da Hb é dada pela curva de saturação em função da pressão parcial de oxigênio (figura 1.4).

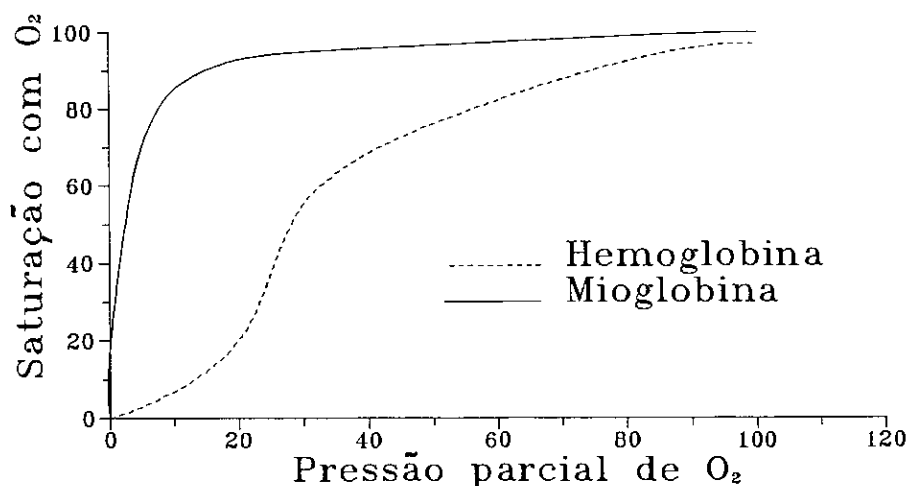


Figura 1.4: Curvas de saturação

Para mioglobina (hemoproteína de armazenamento e transporte de  $O_2$  nos músculos), que tem somente uma cadeia polipeptídica, a curva de saturação é uma hipérbole. Já para Hb a curva de saturação é uma sigmóide. Esta forma está relacionada com a cooperatividade entre os ferros da molécula. O modelo mais simples usado para explicar este comportamento é o modelo alostérico proposto por Monod, Wyman and Changeaux [6].

Este modelo assume que cada subunidade pode existir em duas conformações diferentes: uma T ou tensa com baixa afinidade para  $O_2$  e outra R ou relaxada com alta afinidade.

As constantes de associação para a interação do  $O_2$  com as subunidades no estado T e R são  $A_T$  e  $A_R$ , e sua razão  $A_T/A_R$  é chamada  $c$ . A constante de equilíbrio é dada por  $Kc^n$ , onde  $n$  é o número de ligantes ligados.

Quando o primeiro  $O_2$  se liga na molécula com configuração T (desoxiHb), uma certa quantidade de tensão é introduzida. Esta tensão diminuiria se a molécula relaxasse para o estado R, e é responsável pelas diferentes constantes de associação  $A_T$  e  $A_R$ . A ligação de mais moléculas de  $O_2$  aumenta a tensão total até acontecer a transição T-R. Inversamente quando uma molécula completamente oxigenada (forma R) desliga um ou dois oxigênios ela muda a estrutura, diminuindo a sua afinidade e desligando o último  $O_2$  mais facilmente.

Junto com o movimento do ferro em relação ao plano da heme durante a transição da forma desoxi para oxi aparecem várias mudanças e deslocamentos de vários Å em toda a molécula. Esta é a base molecular para as tensões introduzidas quando uma

molécula de  $O_2$  se liga a Hb no estado T.

Mais recentemente a análise do comportamento de recombinação de moléculas de CO fotodissociadas da heme para temperaturas de 40K a 300K, levou a elaboração de modelos dinâmicos para a reação entre o 6º ligante e o átomo de ferro.

O primeiro modelo dinâmico [7] assume que existem vários subestados conformacionais e que para temperaturas superiores a 200K cada molécula muda rapidamente de um subestado para outro enquanto que para temperaturas inferiores a 200K cada molécula fica em um determinado subestado com uma energia de ativação,  $E$ . A função distribuição  $g(E)$ , que mede a probabilidade de encontrar uma molécula num subestado conformacional associado à energia de ativação  $E$ , independe da temperatura.

Outros modelos dinâmicos microscópicos assumem que os subestados conformacionais obedecem a uma distribuição de Boltzmann, e isto leva a uma distribuição de energia que depende da coordenada conformacional  $x$  que descreve o efeito total da vizinhança sobre a heme. O potencial total da proteína é dado pela soma do potencial de reação  $V(r)$  ( $r$  é a distância entre o ligante e o ferro) com o potencial conformacional  $V(x)$ . Os modelos microscópicos supõe que  $V(x)$  pode ser harmônico [8] ou anarmônico [9].

Embora estes modelos dinâmicos tenham sido feitos originalmente para mioglobina, a comparação dos três modelos com resultados experimentais para temperaturas de 100K, 140K e 180K mostram que eles podem também ser usados para Hb [10].

## 1.2 Metahemoglobina e hidroxihemoglobina

Como citado anteriormente, além de  $O_2$ , outras moléculas podem ocupar a sexta posição do ferro da heme, alterando a sua valência e seu estado de spin como mostrado na tabela 1.1.

Valência	Ligante	spin (S)	
$Fe^{2+}$	Nenhum(desoxi)	2	Spin alto
	$O_2$	0	Spin baixo
	NO	0	
	CO	0	
$Fe^{3+}$	$H_2O$	5/2	Spin alto
	$F^-$	5/2	Spin baixo
	$(OH)^-$	1/2	
	$(CN)^-$	1/2	

Table 1.1: Alguns ligantes que podem ocupar a 6ª coordenação do ferro da heme e o efeito sobre a valência e o estado de spin do ferro

Quando o sexto ligante é uma molécula de água o derivado é chamado metaHb, o estado de spin é 5/2 e a valência +3. A molécula de  $H_2O$  ligada ao ferro forma ponte de hidrogênio com a histidina distal  $E_7$ . Em pH alto um íon hidróxido  $OH^-$ , ao invés de uma molécula de  $H_2O$ , se liga ao ferro da heme. Neste caso o estado de spin é 1/2 e o derivado é chamado hidroxihb.

A mudança no estado eletrônico do ferro é consequência da mudança do campo cristalino devido a alteração estrutural, principalmente, na vizinhança da heme. O estado de spin alto ( $S=5/2$ ) corresponde a um campo cristalino fraco enquanto que spin baixo ( $S=1/2$ ) corresponde a um campo forte.

Algumas vezes em hemoproteínas aparece uma mistura de spin baixo e spin alto. Tal fato levou a hipótese da existência de um equilíbrio térmico entre os dois estados, que pode ser interpretado baseado em uma distribuição do campo cristalino em torno de um valor crítico, no qual os dois estados tem a mesma energia. Esta distribuição pode estar relacionada com as várias conformações da Hb [11].

### 1.3 Hemicromos

A formação de derivados de metaHb de spin baixo também acontece quando a sexta posição é ocupada por um ligante endógeno. Isto é causado por uma alteração na globina e os derivados obtidos são chamados hemicromos.

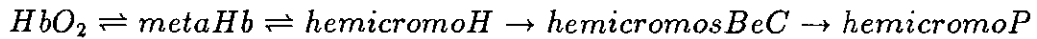
O aparecimento dos hemicromos está relacionado com a perda de solubilidade da Hb que quando precipitadas são conhecidas como corpos de Heinz e que levam a rápida destruição da hemácia [12].

Experiências com moléculas de oxiHb mostram que espontaneamente a amostra se transforma em metaHb que por sua vez se transforma em hemicromos. A taxa da conversão espontânea de metaHb no primeiro hemicromo é menor em Hb A (normal) do que no mutante Hb H (com quatro cadeias  $\beta$ ), que por sua vez é menor do que em



cadeias  $\alpha$  férricas isoladas [2], o que mostra a importância da estrutura quaternária na estabilidade da molécula.

As transformações de uma espécie em outra são consideradas passos intermediários do processo de desnaturação e a sequência das reações é [13]:



No hemicromo H o ferro está ligado a duas histidinas: a histidina proximal F9 ligada na 5ª posição da Hb (como na forma nativa), e a histidina distal E7. Este hemicromo aparece quando perturbações da estrutura terciária da proteína causadas pelo rompimento de algumas pontes de hidrogênio da estrutura quaternária (globina) movem a hélice E o suficiente para que a histidina distal se ligue ao ferro. Se as perturbações não são muito grandes a molécula pode se reorganizar, isto é, a hélice E pode voltar a sua posição original e o hemicromo é reversível. O sinal de RPE característico do hemicromo H pode ser obtido pela adição de histidinas em amostras de metaHb A [14].

Se as perturbações são grandes a molécula se desnatura irreversivelmente e uma nova espécie de hemicromo é formada. Esta nova espécie também têm átomos de N das histidinas como os ligantes axiais do ferro, entretanto a estrutura proteica está bastante alterada de modo que o  $N_{prox}$  de cada histidina está protonado, como se estivesse exposto ao solvente. Estes ligantes são os mesmos que são encontrados no citocromo  $b_5$ , por isso este hemicromo é chamado hemicromo B [15].

A continuação do processo de desnaturação da proteína pode causar o aparecimento de outro hemicromo irreversível que têm o mesmo sinal de RPE do citocromo c. Os

ligantes do ferro nesse caso são o N do grupo imidazol proximal e um enxofre de uma metionina [16].

A última espécie é um hemicromo irreversível no qual o sexto ligante é um mercapeptídeo, provavelmente de uma cisteína, e o 5º é uma base nitrogenada. Este hemicromo é chamado hemicromo P devido as semelhanças do sinal de RPE com o sinal de spin baixo do citocromo P-450 [17].

As estruturas nas vizinhanças das hemes de alguns desses ferrihemicromos reversíveis e irreversíveis são mostrados na figura 1.5.

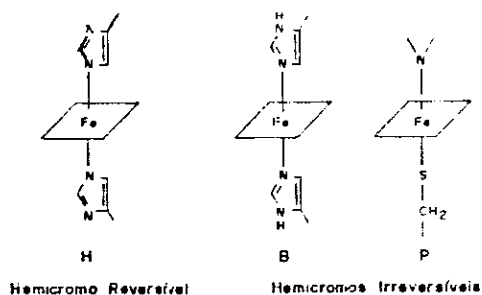


Figura 1.5: Esquema da estrutura na vizinhança de alguns dos hemicromos

# Capítulo 2

## Ressonância paramagnética eletrônica

### 2.1 Condição de ressonância e valor de $g$

Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica associada a absorção de energia por um elétron desemparelhado durante a transição induzida entre dois estados Zeeman adjacentes [19,20].

O momento magnético  $\mu$  de um elétron desemparelhado pode ser escrito em função do momento angular de spin como:

$$\mu = -g\beta\mathbf{S} \quad (2.1)$$

onde  $g$  é o fator giromagnético e  $\beta$  é o magneton de Bohr.

A energia de interação do momento magnético com um campo externo  $\mathbf{H}$  de intensidade uniforme  $H_0$  é calculada pelo hamiltoniano,  $\mathcal{H}$

$$\begin{aligned} \mathcal{H} &= -\mu \cdot \mathbf{H} \\ &= g\beta\mathbf{H} \cdot \mathbf{S} \\ \mathcal{H} &= g\beta H_0 S_z \end{aligned} \quad (2.2)$$

onde  $S_z$  é o operador correspondente à projeção do momento angular de spin ao longo da direção do campo.

A técnica de RPE consiste em irradiar a amostra com um campo eletromagnético com energia  $h\nu$  para inverter a orientação do momento angular de spin dos elétrons, isto é, provocar transições entre estados com  $\Delta S = \pm 1$ . A diferença de energia entre esses estados é  $g\beta H_0$ . Portanto a condição de ressonância, levando a absorção de energia pela amostra, é dada por

$$h\nu = g \beta H_0 \quad (2.3)$$

ou seja para  $H_0 = h\nu/g\beta$

Embora teoricamente seja possível atingir a condição de ressonância variando tanto o campo magnético como a frequência, existem várias razões práticas para o uso de espectrômetros de frequência fixa [20].

Para o elétron livre,  $g = 2,0023$ , enquanto que em moléculas o fator  $g$  depende da orientação em relação a um sistema associado a molécula e, no caso mais geral, é um tensor anisotrópico simétrico com seis componentes  $g_{ij}$

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{xy} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{xz} & g_{yz} & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

É sempre possível encontrar o sistema de referências adequado onde o tensor  $g$  é

O tensor  $\mathbf{A}$  reflete a intensidade da interação e muitas vezes pode ser obtido diretamente dos espectros, como veremos para o caso de NOHb. No caso isotrópico  $\mathbf{A}$  é igual em todas as direções e chamado constante de acoplamento hiperfino.

O efeito da interação hiperfina nos espectros pode ser facilmente previsto e é consequência da introdução de um campo magnético  $H_n$  associado ao momento magnético nuclear nas diferentes orientações,  $m_i$ . A condição de ressonância, no caso isotrópico, é dada por

$$h\nu = g\beta H_i + Am_i$$

$$H_i = \frac{h\nu - Am_i}{g\beta} \quad (2.10)$$

O campo  $H_n$  assume  $2I+1$  valores diferentes, devido aos diferentes valores de  $m_i$ . O número de valores possíveis de  $H_n$  é o número de desdobramentos hiperfinos e a separação entre as linhas é dada pela constante de acoplamento hiperfino.

Se existem  $n$  núcleos equivalentes com spin nuclear  $I$  interagindo com o elétron desemparelhado, o espectro apresenta  $2nI+1$  desdobramentos hiperfinos. Se os núcleos são inequivalentes, o número de desdobramentos é dado pelo número de combinações possíveis de orientações dos diferentes núcleos, isto é, pelo produto dos números de desdobramentos de cada núcleo. Por exemplo, para dois núcleos inequivalentes tendo spin nuclear  $I=1$ , o número de desdobramentos é  $3 \times 3 = 9$ .

## 2.2 Dependência do sinal de RPE com a temperatura

Para um sistema em equilíbrio térmico a temperatura  $T$ , sob ação de um campo magnético  $H_0$ , a população de spins no nível de energia superior  $n_2$  está relacionada com o número no nível inferior  $n_1$  pela distribuição de Boltzmann

$$\begin{aligned}n_2 &= n_1 \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \\n_2 &= n_1 \exp\left(-\frac{g\beta H_0}{kT}\right)\end{aligned}\tag{2.11}$$

A intensidade do sinal de RPE é proporcional a diferença de população entre os níveis envolvidos na transição,  $n = n_2 - n_1$ , e o valor desta em determinado campo  $H_0$  pode ser obtida em função de  $N = n_2 + n_1$ , o número total de spins, do seguinte modo:

$$\frac{n}{N} = \frac{1 - \exp\left(-\frac{g\beta H_0}{kT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{g\beta H_0}{kT}\right)}\tag{2.12}$$

A altas temperaturas,  $g\beta H_0 \ll kT$  (para espectrômetros de banda-X e elétrons livres  $g\beta H_0 = 2,96 \cdot 10^{-18}$  ergs, enquanto que  $kT$  a temperatura ambiente é  $4,14 \cdot 10^{-14}$  ergs), o termo exponencial pode ser expandido em uma série de potências, resultando

$$\frac{n}{N} = \frac{g\beta H_0}{2kT}\tag{2.13}$$

A equação 2.13 mostra que a sensibilidade é inversamente proporcional à temperatura, isto significa que a absorção observada a temperatura de nitrogênio líquido (77K) seria, e geralmente é, quatro vezes maior que à temperatura ambiente. Um aumento maior na sensibilidade é possível em temperaturas próximas de hélio líquido (4,2K) embora outros fatores, particularmente saturação, tornam-se importantes.

A absorção da radiação de microonda tende a igualar a população nos dois níveis, diminuindo a quantidade de energia absorvida pela amostra, ou seja, a intensidade do sinal de RPE. No entanto mecanismos de relaxação longitudinal, devido à interação do elétron desemparelhado com o resto da cadeia, e transversal, devido à interação dipolar ou de troca entre os elétrons, dissipam a energia absorvida e restabelecem a distribuição de Boltzmann para a população dos níveis. Se a taxa de absorção de microonda é muito maior do que a taxa de relaxação obtém-se um sinal saturado, cuja intensidade independe ou diminui com a potência de microonda.

## 2.3 Modulação

Quando o campo magnético atinge a condição de ressonância, a amostra absorve uma determinada quantidade de energia, entretanto esta absorção é pequena e tipicamente menor que o ruído aleatório de um circuito eletrônico.

Para a amplificação do sinal, a absorção dc é convertida para uma ac modulando o campo magnético externo  $H_0$  com um campo senoidal secundário de frequência fixa  $\omega_m$  (100 kHz) e amplitude  $H_m$  escolhida experimentalmente. A detecção é feita com um detetor do tipo 'lock-in' que responderá somente a sinais com frequência igual a  $\omega_m$ . A amplificação desses sinais permite uma melhor relação sinal-ruído, já que somente sinais com  $\omega_m$  serão amplificados cortando os ruídos de baixa frequência característicos do detetor dc eletrônico.

A modulação aumenta a resolução dos sinais através da obtenção das derivadas da absorção de energia em função do campo magnético. As derivadas são geradas pelos

harmônicos da modulação: a detecção do 1º harmônico resulta num espectro que é a primeira derivada do espectro de absorção, a do segundo harmônico, em um espectro igual a segunda derivada e assim por diante.

A intensidade do sinal cresce com o aumento da amplitude de modulação,  $H_m$ , até o valor limite  $(H_m)_{max}$  aproximadamente igual a largura de linha do espectro. Acima desse valor o sinal (supermodulado) diminui e é distorcido, e algumas características não são observadas.

## 2.4 Ion *Fe* em hemoproteínas

### 2.4.1 Teoria de campos ligantes

Um átomo de ferro tem 26 elétrons, sendo que 18 estão em camadas fechadas e 8 na configuração orbital  $3d^64s^2$ . A camada 3d consiste de 5 orbitais  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ,  $d_{z^2}$  e  $d_{x^2-y^2}$ . Os orbitais  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$  e  $d_{yz}$  são denominados  $t_{2g}$  e,  $d_{z^2}$  e  $d_{x^2-y^2}$  são chamados  $e_g$ .

Teoricamente o átomo de ferro do grupo heme apresenta pelo menos quatro estados de oxidação (+1—+4) acessíveis [21], embora somente os estados +2 e +3, estados ferroso e férrico respectivamente, são mais encontrados. Cada um desses estados de oxidação pode existir em vários estados de spin. No entanto, só os estados ferroso e férrico de spin alto e baixo são observados em hemoproteínas, como mostrado na tabela 1.1.

O estado ferroso  $Fe^{+2}$  aparece, por exemplo, em amostras com ligante CO com configuração  $d^6(t_{2g}^6)$  e spin baixo  $S = 0$ , ou no estado desoxigenado com a 6ª ligação livre e configuração  $d^6(t_{2g}^4e_g^2)$  e spin alto  $S = 2$ . O estado de spin intermediário não é





observado.

O estado férrico  $Fe^{+3}$  aparece em espécies com spin baixo com configuração  $d^5(t_{2g}^5)$  e  $S = 1/2$ , como por exemplo  $HbCN^-$ , em espécies com spin alto com  $d^5(t_{2g}^3e_g^2)$  e  $S = 5/2$ , como HbF, ou em espécies que podem existir nas duas configurações como metahemoglobina, mas não existe derivados com  $S = 3/2$ .

As características dos sinais de RPE do  $Fe^{+3}$  são determinadas pela simetria do campo ligante, que por sua vez é determinada pela natureza química dos ligantes vizinhos e seus arranjos geométricos. Em soluções de heme férrica isolada da proteína onde o ferro está ligado aos quatro átomos da porfirina através de ligações covalentes, a simetria é tetragonal ou de ordem 4. Entretanto, heme férricos inseridos em matrizes proteicas exibem desvios da simetria tetragonal, pois a globina pode impor vínculos às hemes que alteram esta simetria.

A degenerescência de ordem 5 de um elétron d simples é removida em parte pelo campo ligante octaedral como mostrado na figura 2.1a. Este mesmo esquema de níveis é útil para visualizar o que acontece quando existem 5 elétrons 3d, como para  $Fe^{+3}$ .

O estado de spin alto ocorre para um campo ligante suficientemente fraco em relação a repulsão elétron-elétron que leva a uma multiplicidade de spin máxima (figura 2.1b).

O estado spin baixo aparece quando a intensidade do campo ligante é maior do que a repulsão entre os elétrons, isto é, quando é desfavorável energeticamente ter um ou mais elétrons no orbital  $e_g$  (figura 2.1c).

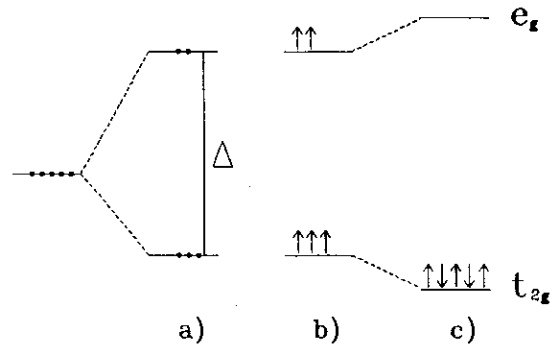


Figura 2.1: Efeito do campo ligante no orbital  $3d$ . a)életron  $d$  simples b)spin alto c)spin baixo

### 2.4.2 Spin alto: $S = 5/2$

O campo ligante presente em hemoproteínas férricas de spin alto separa o estado fundamental em três dubletos de Kramer com  $S = \pm 1/2$ ,  $\pm 3/2$  e  $\pm 5/2$ .

Para hemoproteínas com simetria tetragonal a separação entre os dubletos são dadas por  $2D$  e  $4D$  respectivamente (figura 2.2), onde  $D$  é o desdobramento a campo nulo no hamiltoniano de spin que, nesse caso, é dado por

$$\mathcal{H} = g\beta\mathbf{H}\cdot\mathbf{S} + D[S_z^2 - \frac{S(S+1)}{3}] + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (2.14)$$

onde  $E$  é o parametro de simetria rômbrica.

Em espectromêtros de banda-X ( $\sim 9$  GHz), a energia de microonda  $h\nu$  é muito menor que a separação entre os dubletos. Para hemoproteínas férricas o campo necessário para transições entre os estados dos dubletos intermediário e superior é maior do que o valor do campo máximo típico de operação do espectrômetro. Portanto transições de RPE ocorrem, nesse caso, somente no dubleto de menor energia ( $S = \pm 1/2$ ).

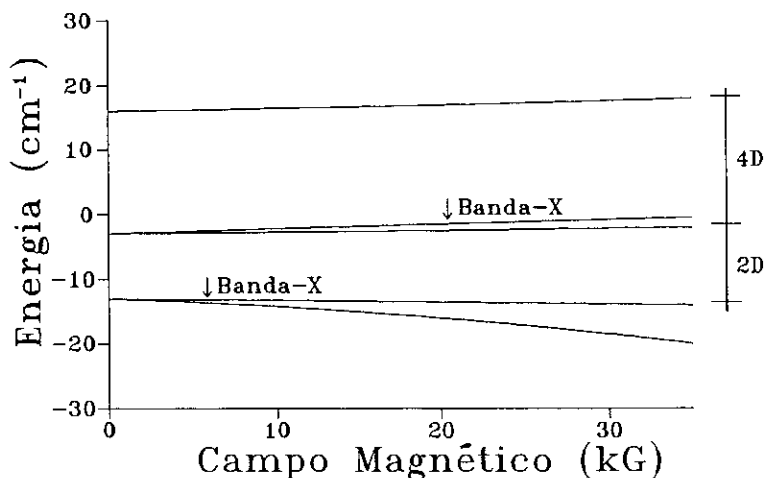


Figura 2.2: Níveis de energia de um íon com  $S = 5/2$  em um campo magnético. As setas indicam a região onde a diferença de energia é da ordem da energia típica de espectrômetros de banda-X.

As populações de cada dubleto em campo magnético nulo em função da temperatura são mostradas na figura 2.3 [22].

Somente em temperaturas muito baixas ( $\simeq 1K$ ) a população está inteiramente no dubleto de menor energia. Conforme a temperatura aumenta, a população deste dubleto diminui e a dos dubletos intermediário e superior aumentam. Em temperaturas muito altas (maiores que 150K) as populações se aproximam assintoticamente de 1/3.

O hamiltoniano efetivo para o dubleto de menor energia, pode ser escrito como

$$\mathcal{H} = g'_{\parallel} \beta H_z S_z + g'_{\perp} \beta (H_x S_x + H_y S_y) \quad (2.15)$$

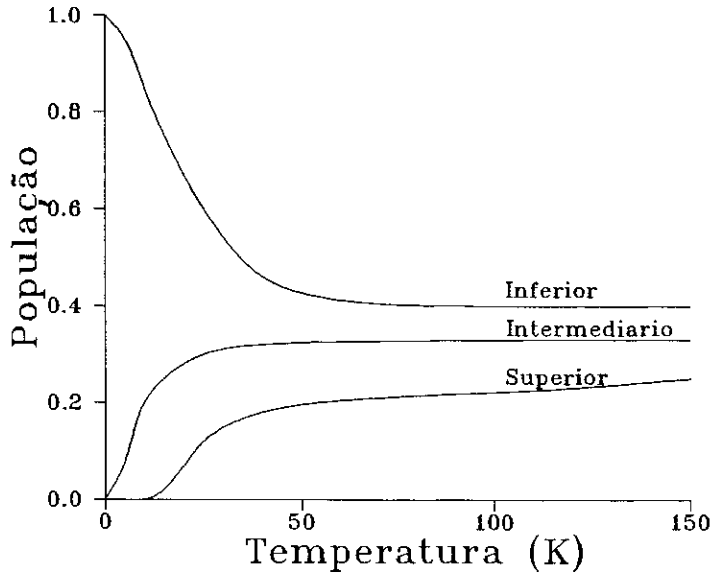


Figura 2.3: Populações dos dubletos em função da temperatura.

Para este hamiltoniano existem dois vetores de base,  $|S M_s\rangle$  com  $M_s = -S, -S + 1, \dots, S - 1, S$ , enquanto que para o hamiltoniano anisotrópico 2.14 existiam seis,  $|5/2 M_s\rangle$ . Os elementos de matriz para o estado com mesmo  $M_s$  são iguais nas duas representações [19],

$$\langle 1/2 \ 1/2 | g'_{\parallel} \beta H_z S_z | 1/2 \ 1/2 \rangle = \langle 5/2 \ 1/2 | g \beta H_z S_z | 5/2 \ 1/2 \rangle$$

$$\langle 1/2 \ -1/2 | g'_{\perp} \beta H^+ S^- | 1/2 \ 1/2 \rangle = \langle 5/2 \ -1/2 | g \beta H^+ S^- | 5/2 \ 1/2 \rangle$$

onde

$$S^- = S_x - iS_y$$

$$H^+ = H_x + iH_y$$

Usando as relações

$$\langle S' M'_s | S_z | S M_s \rangle = M_s \hbar \delta_{SS'} \delta_{M_s M'_s}$$

$$\langle S' M'_s | S^\pm | S M_s \rangle = \hbar[(S \mp M_s)(S \pm M_s + 1)]^{1/2} \delta_{S S'} \delta_{M_s M'_s \pm 1}$$

encontramos em primeira aproximação

$$g'_{\parallel} = g \simeq 2$$

$$g'_{\perp} = 3g \simeq 6$$

A distorção rômica faz com que as direções  $x$  e  $y$  não sejam mais magnéticamente equivalentes. O termo adicional na equação 2.14 causa o desdobramento de  $g_{\perp}$  em

$$g_x = 6 - 24E/D$$

$$g_y = 6 + 24E/D$$

A relação  $E/D$  pode ser calculada dando

$$\frac{E}{D} = \frac{|g_x - g_y|}{48} \leq \frac{1}{3}$$

E o grau de distorção rômica ou rombicidade é definido como [22]

$$\%rombicidade = \frac{|g_x - g_y|}{16} 100\%$$

Espectros apresentando as características discutidas acima são mostrados na figura 2.4 [18].

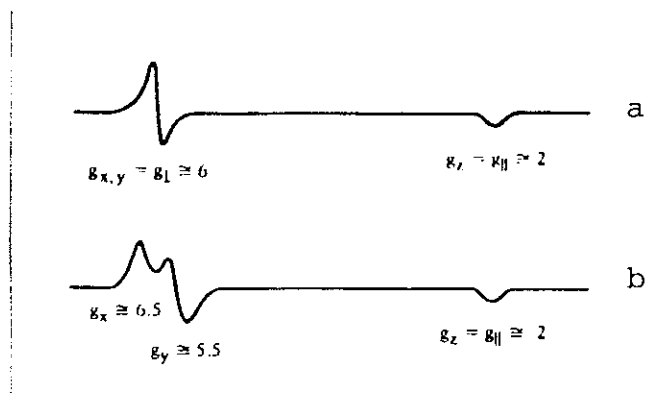


Figura 2.4: Espectros de hemoproteínas com spin alto a) simetria tetragonal b) simetria tetragonal e distorção rômica

### 2.4.3 Spin baixo $S = 1/2$

A configuração eletrônica de uma hemoproteína férrica de spin baixo é escrita como  $t_{2g}^5$  ou explicitamente como  $d_{xy}^2 d_{xz}^2 d_{yz}$ . Possíveis contribuições de  $d_{x^2-y^2}$  e  $d_{z^2}$  são muito pequenas e desprezadas na maioria dos tratamentos.

Se a simetria da heme é octaédrica, então o elétron é distribuído igualmente entre todos os três orbitais. Não existe eixo único para um momento angular orbital resultante, conseqüentemente o fator- $g$  é definido somente pelo spin do elétron e  $g_x = g_y = g_z \cong 2$ .

Por outro lado se o elétron desemparelhado ficar completamente no orbital  $d_{yz}$  e os outros dois orbitais  $t_{2g}$  estiverem tão distantes energeticamente que não se misturam com  $d_{yz}$  por interação spin-órbita, então novamente não existe momento angular orbital resultante e todos os valores de  $g$  são iguais a 2.

Entretanto, o espectro de RPE típico de ferrihemoproteínas de spin baixo (figura 2.5)

[16] apresenta três valores de  $g$  diferentes. O que mostra que os três orbitais têm energias diferentes e que o elétron desemparelhado não está nem em um orbital degenerado de ordem 3, nem exclusivamente no orbital  $d_{yz}$ , mas numa mistura de orbitais  $t_{2g}$  que é introduzida pela interação spin-órbita.

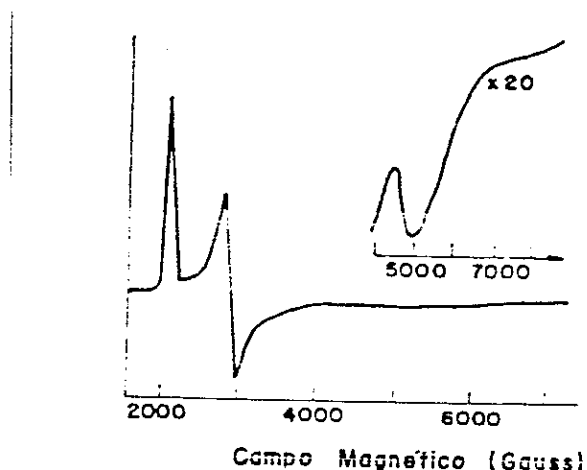


Figura 2.5: Espectros de RPE de ferrihemoproteínas com spin baixo

Esta diferença de energia é causada por um campo ligante assimétrico, devido principalmente às características dos ligantes no 5º e 6º sítio de coordenação do ferro.

A componente não esférica dos campos ligantes pode ser decomposta em duas componentes : axial e rômbrica. A componente axial ao longo do eixo  $z$ , perpendicular ao plano da heme, desestabiliza  $d_{xz}$  e  $d_{yz}$  com relação a  $d_{xy}$  por uma quantidade  $\Delta$  (figura 2.6). A componente rômbrica produz uma diferença entre as direções  $x$  e  $y$  tal que  $d_{xz}$  é mais estável que  $d_{yz}$  por uma quantidade  $V$ .

A distorção rômbrica é máxima quando  $V/\Delta = 2/3$ , pois valores maiores de  $V$  levam

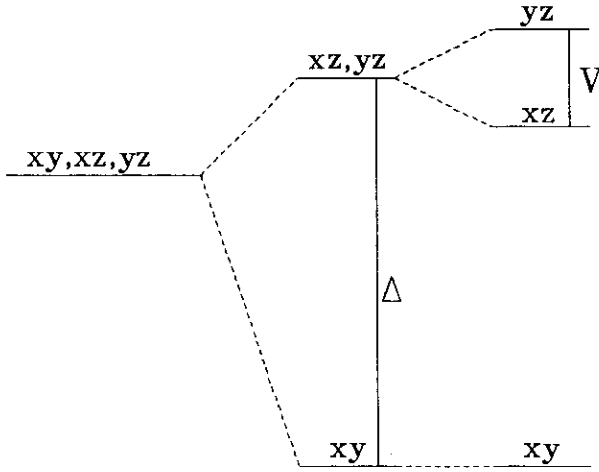


Figura 2.6: Orbital  $t_{2g}^5$  em diferentes condições de campo cristalino

a uma mudança qualitativa da fig. 2.6 tal que é possível redefinir o eixo cristalino de modo que  $V/\Delta \leq 2/3$ .

A primeira análise da anisotropia do sinal de RPE de spin baixo foi feita por Griffith [19]. Neste modelo as funções de onda são expressas como combinação linear de três orbitais possíveis

$$|\Psi^+\rangle = a|\varepsilon^+\rangle + ib|\eta^-\rangle + c|\zeta^+\rangle$$

$$|\Psi^-\rangle = a|\varepsilon^-\rangle + ib|\eta^+\rangle + c|\zeta^-\rangle$$

onde os orbitais  $d_{yz}$ ,  $d_{xz}$  e  $d_{xy}$  são representados por  $\varepsilon$ ,  $\eta$  e  $\zeta$ ;  $|\Psi^-\rangle = i|\Psi^+\rangle$ ; a, b e c são reais tais que  $a^2 + b^2 + c^2 = 1$  e, + e - representam o estado de spin eletrônico.

Taylor [23] propôs uma representação alternativa para o estado fundamental para simplificar as equações

$$|\Psi^+\rangle = a|\varepsilon^+\rangle - ib|\eta^+\rangle - c|\zeta^-\rangle$$

$$|\Psi^-\rangle = -a|\varepsilon^-\rangle - ib|\eta^-\rangle - c|\zeta^+\rangle$$



A interação com o campo magnético externo é dado por

$$\beta \mathbf{H} \cdot (\mathbf{L} + 2\mathbf{S})$$

e a separação de energia ao longo de um eixo  $i$  é  $g\beta H_i$ .

A representação de Taylor das funções de onda leva aos seguintes valores principais de  $g$

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

$$g_y = 2[(a + c)^2 - b^2]$$

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

Para um orbital isolado ( $a = 1, b = c = 0$ ) e para um orbital degenerado de ordem 3 ( $a = b = c = 0,577$ ), o módulo de todos os três valores de  $g$  é 2.

Os coeficientes são

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

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

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

Os desdobramentos de energia, em unidades da constante de acoplamento spin-órbita  $\lambda$ , são:

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

$$\frac{\Delta}{\lambda} = \frac{g_x}{2(g_z + g_y)} + \frac{g_z}{g_y - g_x} + \frac{g_y}{2(g_z - g_x)}$$

Tem-se ainda que

$$g_z + g_y - g_x = 2(a + b + c)^2$$

$$g_x^2 + g_y^2 - g_z^2 - g_x g_z - g_x g_y + g_y g_z + 4g_x - 4g_y - 4g_z = 0 \quad (2.16)$$

Portanto é sempre possível calcular qualquer valor de  $g$  se tivermos os outros dois.

## 2.5 Nitrosilhemoglobina (NOHb)

O óxido nítrico (NO) se liga reversivelmente na hemoglobina com o ferro na forma  $Fe^{+2}$  em atmosfera anaeróbica, e é usado como um possível modelo para ligação do oxigênio, com a vantagem de poder ser estudado por RPE, uma vez que o grupo NO apresenta um elétron desemparelhado.

As características do espectro são devidas principalmente às interações do elétron desemparelhado com os núcleos de nitrogênio localizados ao longo da normal da heme, ou seja, o N do próprio NO e o N do grupo imidazol proximal.

Dependendo do número de átomos de  $^{14}N$  (spin nuclear  $I = 1$ ) que interagem com o elétron desemparelhado, devemos esperar diferentes desdobramentos hiperfinos: a interação com um núcleo resulta num sinal com três linhas, com dois núcleos equivalentes um sinal com cinco linhas e com dois núcleos inequivalentes um sinal com nove linhas.

As estruturas quaternárias oxi (R) e desoxi (T) apresentam sinais de RPE diferentes e a transição entre elas pode ser facilmente observada. Esta transição pode ser induzida pelo inositolhexafosfato (IHP) [24] ou por variações de pH [25,26]. Tanto no estado R como no estado T o espectro de NOHb pode ser reconstituído pela soma dos espectros das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas [27,28].

No estado R os espectros das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são semelhantes. Esses espectros são característicos de um sistema com simetria rômbrica em um estado de hexacoordenação

para o ferro. Existe um desdobramento hiperfino com nove linhas, que fica bem resolvido usando a técnica de detecção de terceiros harmônicos [30], devido a contribuição do  $^{14}\text{N}$  do grupo NO e N do imidazol proximal.

O espectro do estado T é mais complicado porque o espectro da cadeia  $\beta$  não sofre alterações em relação a forma R enquanto que o da cadeia  $\alpha$  muda drasticamente, passando a apresentar um desdobramento hiperfino com três linhas bem resolvidas devido ao  $^{14}\text{N}$  do grupo NO e nenhuma contribuição do N do imidazol proximal (fig. 2.7) [29].

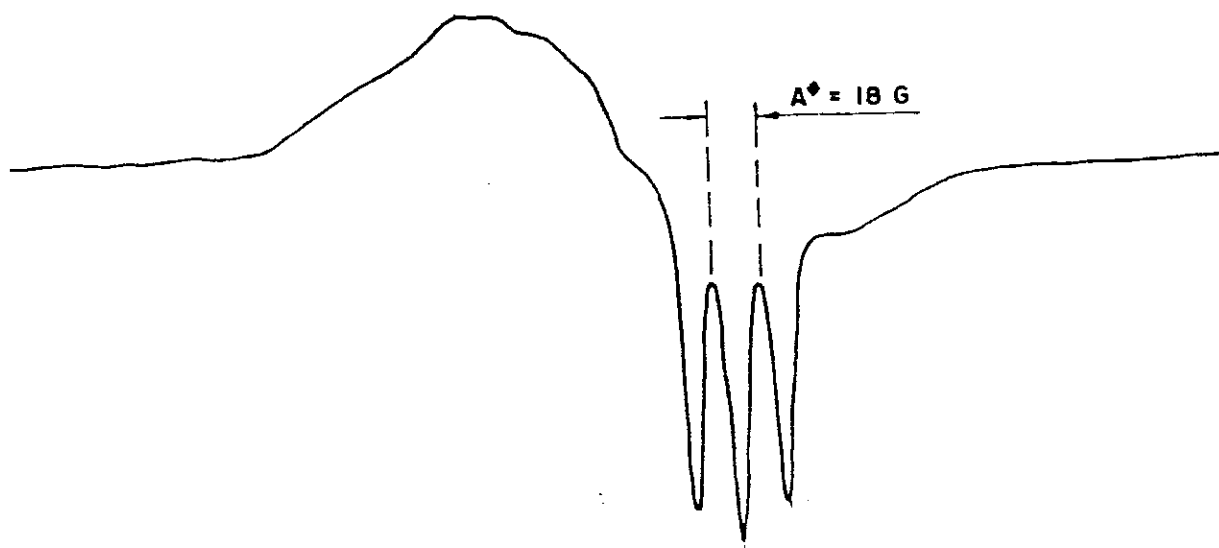


Figura 2.7: Espectros de NOHb no estado T, mostrando a constante de acoplamento hiperfino A.

Entretanto o aparecimento (ou desaparecimento) do desdobramento hiperfino também está relacionado com outros fatores como por exemplo concentração de NO, desnaturação, estrutura terciária e origem da proteína. Em amostras de mioglobina (uma

única cadeia polipeptídica) com concentração baixa de NO, o espectro apresenta um triplete hiperfino com centro em  $g=2,0025$ . O aumento da concentração de NO, modifica o sinal para um com simetria rômica característico do estado R [31]. Uma transformação contrária é observada quando amostras no estado R são desnaturadas por detergentes [3].

A dependência da transição R-T com a estrutura terciária e quaternária da proteína é comprovada pelas diferentes quantidades de cadeias que estão no estado T na Hb humana e de carpa (humana:50% , carpa:25% ) em pH 5,8 com IHP [32], ou pela quantidade que estão no estado T em qualquer pH abaixo de 7,0 sem IHP em HbA e HbF (Hb humana fetal, as cadeias  $\beta$  são substituídas por cadeias  $\gamma$ ) [30].

Além disso experiências recentes de RPE mostram que os espectros de NOHb são constituídos por no mínimo três componentes diferentes. Cada espectro é composto por combinações, que dependem da temperatura e potência de microonda, de somente duas componentes. Embora existam algumas semelhanças, estas espécies não parecem estar diretamente relacionadas com os estados R e T das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  [33].

Devido a complexidade do espectro vários modelos experimentais e teóricos tem sido propostos para explicar as mudanças espectrais da transição R-T.

Baseado em estudos de modelos de heme bi-imidazol, isto é, com dois grupos imidazóis ocupando a 5ª e 6ª ligações da heme, que mostram que o imidazol pode se ligar a heme em duas configurações: protonado ou desprotonado, foi proposto um modelo em que as mudanças espectrais estão associadas às mudanças estruturais do imidazol proximal quando o  $N_{prox}$  está protonado ou desprotonado [30,34].

Outro modelo, baseado na análise dos deslocamentos do tensor  $g$  e do tensor hiperfino  $A$ , sugere que o espectro com nove linhas é devido à uma ligação  $F_e-N-O$  em dobra com o ângulo de ligação de  $105^\circ$  enquanto que o espectro com três linhas é devido à uma ligação  $F_e-N-O$  linear [35].

O outro modelo alternativo sugere que o aparecimento do desdobramento hiperfino para a cadeia  $\alpha$  é causado por um enfraquecimento, ou até quebra, da ligação entre o ferro e a histidina proximal. Os dados experimentais que sustentam este modelo são as semelhanças observadas por RPE [36], ressonância Raman [32] e espectroscopia infra-vermelho [37] entre os complexos modelos pentacoordenados e NOHb no estado T.

Os modelos teóricos relacionam os resultados experimentais com a estrutura eletrônica do elétron desemparelhado. Pelo menos quatro estruturas já foram propostas:

- Modelo  $\pi^*(d_{yz})$ : O elétron está em um orbital  $\pi^*$ , sendo as maiores contribuições do orbital  $d_{yz}$  do ferro. Em uma estrutura deste tipo são esperados grandes valores de  $\Delta g$ , o que não é observado em NOHb.
- Modelo  $\pi^*(NO)$ : Mesma estrutura que a anterior com a diferença que a densidade de spin é maior no N do NO [38]. São esperados constantes de acoplamento isotrópica pequena e anisotrópica grande para  $^{14}N$ , diferente do que é observado.
- Modelo de Doetschman: Em uma tentativa para explicar todos os valores de  $g$  e  $A$  dos vários derivados de NO-heme, foi proposto [39] uma estrutura que seria uma mistura de todos os níveis possíveis com as proporções relativas de cada um:

$\pi_y$  (0,18),  $\pi_x$  (0,35),  $d_{xz}$ (0,24) e  $d_{z^2}$ (0,23). Para levar em conta o acoplamento hiperfino grande de  $^{14}\text{N}$  do NO é acrescentado o nível  $\sigma(\text{NO})$ .

- Modelo  $\sigma^*$  : O elétron está no orbital  $3d_{z^2}$  do ferro com suave deslocalização no orbital N( $\sigma$ ) do  $\text{N}_e$  e grande deslocalização no orbital NO( $\sigma, \pi$ ) (figura 2.8) [40].

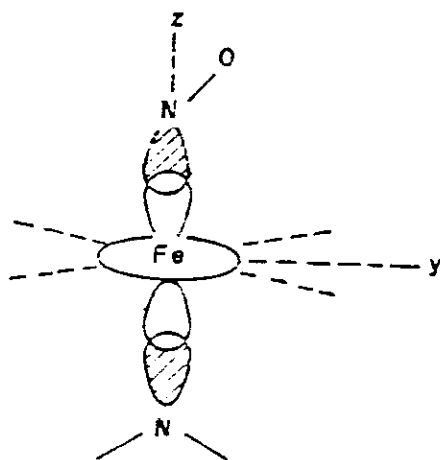


Figura 2.8: Estrutura eletrônica do modelo  $\sigma^*$

Além dos resultados acima, existem outros aspectos dos resultados que mostram que o modelo  $\sigma^*$  parece ser o mais completo [41]. Os cálculos deste modelo mostram que o tripleto hiperfino da cadeia  $\alpha$  está associado a um aumento da distância, em torno de 0,5–1 Å, entre o Fe e o N do imidazol proximal.

# Capítulo 3

## Desnaturação de proteínas

### 3.1 Estado nativo

Todas as proteínas são construídas com elementos do mesmo conjunto de 20 aminoácidos, os aminoácidos primários ou  $\alpha$ -aminoácidos. Cada aminoácido tem em uma extremidade um grupo amino  $NH_3^+$  e na outra uma carboxila  $COO^-$ , que estão ligados a um átomo de carbono central, chamado carbono- $\alpha$  ( $C_\alpha$ ). Também ligado ao  $C_\alpha$  estão um átomo de hidrogênio e um grupo lateral designado por R. É este grupo lateral que difere de um aminoácido para outro, e são eles que conferem a individualidade química da molécula.

Nas proteínas dois aminoácidos adjacentes estão unidos através de uma ligação denominada ligação peptídica. Para esta ligação ocorrer uma molécula de água é removida, de modo que o átomo de C do grupo carboxila de um aminoácido é diretamente ligado ao N do grupo  $\alpha$ -amino do outro, como mostrado no esquema abaixo:

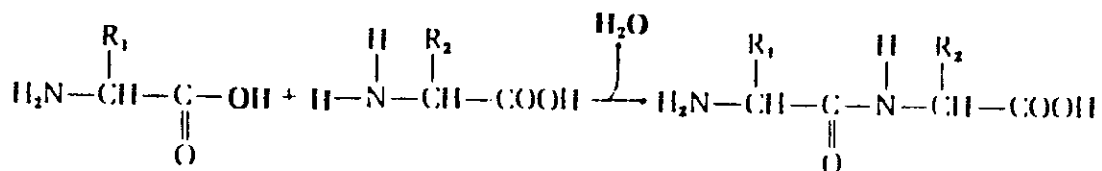


Figura 3.1: Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos

Análises de difração de raios-X mostram que o comprimento (1,32 Å) da ligação entre o C e o N na cadeia peptídica é menor que o comprimento normal (1,47 Å) desta ligação, ou seja, que a ligação simples C—N tem algum caráter de ligação dupla. Devido a isso não pode haver rotações em torno desta ligação e os quatro átomos do grupo peptídico (N, C<sub>α</sub>, C e átomo de R) estão no mesmo plano. Estas ligações mais rígidas impõem restrições ao número de conformações possíveis.

Cada proteína é organizada hierarquicamente em vários níveis estruturais, onde a estabilidade de um nível ou estrutura depende da estabilidade do nível imediatamente inferior e de suas forças de interação. O nível de organização mais baixo é a estrutura primária que é simplesmente a sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica.

A estrutura secundária é a maneira como os aminoácidos se arranjam dentro da cadeia ao longo de uma dimensão. As mais conhecidas são as hélices α e as conformações β. Na Hb existem somente hélices α. As hélices α são estruturas que permitem a formação de pontes de hidrogênio entre cada átomo de H ligado ao átomo de N da ligação peptídica e o átomo de O da carboxila do quarto aminoácido na sequência que



aparecem na cadeia. Todas as ligações peptídicas participam destas pontes de hidrogênio dando a estabilidade da estrutura final.

Distorções de hélices  $\alpha$  e conformações  $\beta$  ocorrem devido à tendência da cadeia peptídica em ir para uma estrutura compacta com espaço vazio mínimo, e também à importância de regiões desordenadas com regras funcionais definidas. A estrutura espacial resultante é chamada estrutura terciária.

Existem proteínas que possuem duas ou mais cadeias separadas. Estas cadeias podem ser idênticas ou diferentes entre si. O arranjo espacial das cadeias, isto é, a maneira como elas estão reunidas e arrumadas na forma nativa das proteínas, é chamado estrutura quaternária.

A Hb é composta de quatro cadeias duas chamadas  $\alpha$  e duas  $\beta$  e o arranjo das quatro cadeias na molécula define sua estrutura quaternária.

## 3.2 Estado desnaturado

O estado completamente desnaturado de uma proteína é definido como sendo o estado conformacional com maior alteração do seu estado nativo sem modificação da sua estrutura primária, isto é, com a cadeia polipeptídica mantendo a mesma sequência de aminoácidos [42].

Inicialmente considerava-se que o estado completamente desnaturado ocorria somente em soluções concentradas de cloreto de guanidina (GuHCl), entretanto o estudo da variação de parâmetros termodinâmicos, tais como entalpia e capacidade calorífica, mostrou que não existe diferença entre o estado final de proteínas desnaturadas termica-

mente ou em soluções concentradas de GuHCl, desde que fossem levadas em consideração efeitos de solvatação do GuHCl [43].

Sob condições de solventes ideais a proteína completamente desnaturada assemelha-se à cadeia aleatória linear, isto é, dentro dos limites previamente mencionados (não existência de rotações em torno da ligação C—N) cada ligação pode girar livremente, independente da rotação dos vizinhos ao longo da cadeia. As propriedades físicas características da cadeia aleatória linear são relativamente fáceis de reconhecer, pois polímeros sintéticos tendem a adotar esta conformação. Portanto, o estado completamente desnaturado de uma proteína pode ser identificado comparando suas propriedades físicas com as dos polímeros sintéticos.

Entretanto as evidências experimentais provando que a cadeia polipeptídica desnaturada representa uma cadeia aleatória linear estão incompletas, ou seja, mesmo no estado completamente desnaturado a cadeia polipeptídica retém resíduos de elementos estruturais bem definidos [44].

### **3.3 Transição do estado nativo para o estado desnaturado**

#### **3.3.1 Transição sem estados intermediários**

Se a transição do estado nativo (N) para o estado desnaturado (D) ocorre sem estados intermediários, todas as moléculas proteicas estão em um dos dois estados. A transição pode ser caracterizada em qualquer estágio por uma variável simples  $f_D$ , a fração de moléculas no estado desnaturado. Se  $y$  representa a variável experimental usada para

seguir a transição, e  $y_N$  e  $y_D$  são os valores característicos de  $y$  para os estados inicial e final, então em qualquer estágio da transição temos:

$$y = y_N + f_D(y_D - y_N) \quad (3.1)$$

ou

$$f_D = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} \quad (3.2)$$

É evidente que cada medida de  $y$  dará um valor único de  $f_D$ , e que a constante de equilíbrio para a reação  $N \rightleftharpoons D$

$$K_D = \frac{f_D}{1 - f_D} \quad (3.3)$$

pode ser calculada para cada ponto experimental.

Estudando a dependência de  $f_D$  com variáveis externas, tais como temperatura ( $T$ ), pressão ( $p$ ) e atividade iônica ( $a_i$ ), podemos encontrar parâmetros característicos do processo de desnaturação. Se esses parâmetros forem derivados usando equações de equilíbrio termodinâmico, eles terão dimensões de grandezas termodinâmicas e serão interpretados fisicamente como variação de:

- Energia Gibbs efetiva

$$- RT \log K_D = \Delta G_{ef} \quad (3.4)$$

- Entalpia efetiva

$$RT^2 \frac{d \log K_D}{dT} = \Delta H_{ef} \quad (3.5)$$

- Volume efetivo

$$- RT \frac{d \log K_D}{dp} = \Delta V_{ef} \quad (3.6)$$

- Quantidade efetiva de ligantes ligados

$$\frac{d \log K_D}{d \log a_i} = \Delta \nu_{ef} \quad (3.7)$$

### 3.3.2 Transição com estados intermediários

Se existirem estados intermediários entre os estados N e D, que chamaremos  $X_1, X_2, \dots$ , e se  $y_{X_1}, y_{X_2}, \dots$  representam os valores de  $y$  que caracterizam a molécula nesses estados, então o valor de  $y$  em qualquer estágio da transição é dado por

$$y = y_N + \sum_i f_{X_i} (y_{X_i} - y_N) + f_D (y_D - y_N) \quad (3.8)$$

A mudança relativa em  $y$  ao ir de N até  $X_C$  é

$$\alpha_i = \frac{y_{X_i} - y_N}{y_D - y_N} \quad (3.9)$$

Se definirmos a mudança observável como

$$f_{ob} = \frac{y - y_N}{y_D - y_N} \quad (3.10)$$

temos

$$f_{ob} = \sum_i \alpha_i f_{X_i} + f_D \quad (3.11)$$

a soma é feita sobre todos os estados intermediários. Se o processo tiver somente dois estados  $f_{ob} = f_D$ .

Embora exista todo um tratamento teórico [42] feito para estudar o processo de desnaturação, a verificação prática é muito difícil. As dificuldades começam pela definição dos estados nativos e desnaturados, principalmente do estado desnaturado. Apesar

desta dificuldade e do fato de usarmos somente uma técnica experimental para caracterizar os estados das amostras, consideraremos como estado desnaturado aqueles que foram tratados termicamente e apresentarem sinais de RPE diferentes daquele que não foi tratado.

Outra dificuldade experimental importante advem da necessidade de estudo de proteínas em soluções diluídas de modo que as interações intermoleculares possam ser desprezadas e as propriedades das moléculas individuais investigadas. Em geral em soluções diluídas as grandezas medidas experimentalmente são muito pequenas e necessitam uma técnica sensível e precisa. Essas dificuldades são ainda maiores para proteínas de alto peso molecular como Hb.

## 3.4 Desnaturação de hemoglobina

### 3.4.1 Desnaturação térmica

O estudo através da variação do sinal de RPE da desnaturação térmica (tempo de desnaturação: 4 min em qualquer temperatura) de oxiHb e metaHb mostra que esta ocorre em etapas, sendo que a primeira etapa para oxiHb é a transformação em metaHb [1].

A primeira etapa da desnaturação de metaHb é caracterizada por um espectro onde os sinais com  $g = 2,27$  e  $g = 1,91$  predominam. E a etapa final é caracterizada pelo diminuição desses sinais e aumento dos sinais com  $g = 2,9$  e  $g = 2,41$ .

A temperatura de transição ( $T_x$ ) foi definida como sendo a temperatura necessária para o sinal com  $g = 2,27$  atingir metade do seu valor máximo. Por esta definição

$T_x$  para oxiHb com força iônica entre 0,05 e 0,1 (NaCl) é igual a 72°C—73°C e para metaHb com força iônica zero é 69°C—71°C.

O fato de os sinais mudarem de amplitudes em pares leva à hipótese de que a variação do sinal da amostra desnaturada é causado por classes diferentes de ferriHb, e que os ligantes (não identificados) poderiam ser da globina desnaturada.

Espectros de RPE de amostras de metaHb mantidas a 80°C por 4 minutos em vários pH mostram que as intensidades dos sinais do espectro da primeira etapa das amostras desnaturadas termicamente aumentam com o aumento do pH, mas que a relação entre as intensidades dos sinais é independente do pH [45].

### 3.4.2 Desnaturação por variação de pH

Todas as formas de Hb sofrem uma mudança conformacional grande quando expostas a pH baixo. Essas mudanças são causadas principalmente pela exposição das histidinas que estavam no interior na forma nativa. As reações são acompanhadas por um aumento da viscosidade intrínseca e por uma perda do vale em 233 nm na curva de dispersão da rotação ótica [42,46].

A desnaturação de metaHb em pH abaixo de 2,5 estudada, através das mudanças no espectro de absorção ótica, apresenta três fases. Em pH um pouco mais alto (2,5 a 3,8) as três fases são indistinguíveis e em altas concentrações de metaHb somente duas fases são distinguíveis [47].

A primeira fase é caracterizada pelo deslocamento da banda de Soret ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) para  $\lambda = 410 \text{ nm}$ . O seu tempo para conclusão desta alteração depende da tempe-

ratura (60 a 70 mseg em 2,5°C, 30 a 40 mseg em 8°C e 10 a 20 mseg em 25°C) e as mudanças no espectro são devidas a mudanças na vizinhança da heme, provavelmente uma aproximação da histidina distal E7 [48].

A outra etapa é caracterizada pelo decréscimo da banda em 410 nm e aparecimento de uma nova banda com máximo em 398 nm, esta fase está associada com a expulsão da heme da globina.

E finalmente a última fase é a dimerização da heme livre e ligação na apoHb (Hb sem heme) em um sítio diferente do que ocupava na proteína nativa. Esta fase é caracterizada pelo aparecimento de uma banda de absorção larga com centro em  $\lambda = 370 \text{ nm}$ .

A desnaturação de COHb em pH ácido depende da ausência ou presença de oxigênio. Na ausência de oxigênio não existe a formação de metaHb e no final a molécula mantém muito da sua estrutura nativa [49].

Na presença de oxigênio COHb é completamente desnaturada da mesma maneira que metaHb em pH abaixo de 3,1, entretanto a heme não é expelida de todas as moléculas na faixa de pH de 2 a 3,1.

O sítio onde a heme dimerizada se religa depende da temperatura e do complexo de Hb, isto é, os sítios são diferentes para proteínas desnaturadas a 25°C e 0°C tanto para COHb como para metaHb. Além disso COHb desnaturadas a 0°C e pH 1,95 apresentam diferenças no espectro de absorção que indicam a existência de alguma outra característica [50].

As amostras de metaHb mantidas durante 4 minutos em pH 2,1 não apresentam sinal de RPE, esta fato foi associado a expulsão parcial da heme da globina desnaturada neste

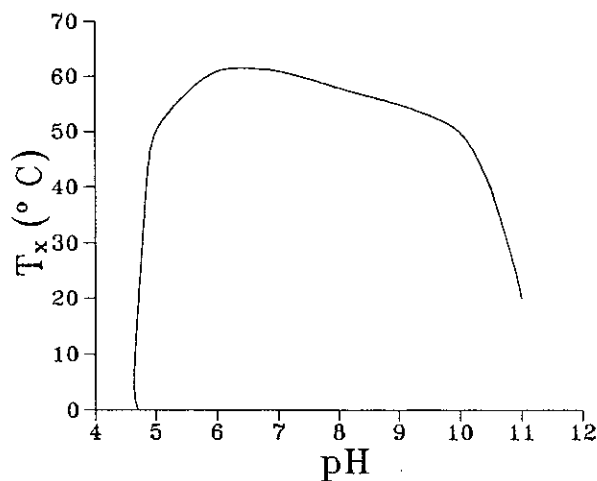


Figura 3.2: Temperaturas de transição

pH, como observado pelas mudanças no espectro de absorção ótica.

Espectros de RPE de metaHb com pH variando de 2,1 a 11 mostram que a temperatura de transição  $T_x$  apresenta o comportamento dado pela figura 3.2 [45], e que metaHb em pH alto tem os mesmos sinais da primeira fase de metaHb desnaturada termicamente ( $g = 2,45$ ;  $2,25$  e  $1,91$ ) e amostras em pH intermediários (6 a 10,3) se transformam em hidroxihb com  $g = 2,53$ ,  $2,14$  e  $1,82$  [45].

### 3.4.3 Desnaturação por solventes orgânicos e sais inorgânicos

As propriedades físicas de oxiHb são alteradas por alcoóis de cadeia curta, dependendo da concentração, temperatura e tempo de incubação com os alcoóis [1].

Alguns compostos (por exemplo propanol) abaixam a temperatura de transição  $T_x$  para temperatura ambiente, ou seja, nesta temperatura eles oxidam oxiHb e levam a



um comportamento do sinal de RPE semelhante ao observado durante a desnaturação térmica de metaHb. Para outros compostos, este comportamento é limitado pela solubilidade do solvente (butanol) ou pela sua ineficiência como agente desnaturante a temperatura ambiente (etanol).

A eficiência dos solventes orgânicos como desnaturantes de Hb em geral aumenta com seu caráter hidrofóbico dentro de cada série homóloga.

Alguns outros solventes orgânicos (metanol) mesmo em concentrações relativamente baixas provocam o aparecimento de um sinal de RPE caracterizado por três linhas estreitas em  $g = 2,5$ ;  $2,14$  e  $1,85$  e uma linha alargada em  $g = 5,9$ . Esses componentes representam desnaturantes fracos que mostram pouca ou nenhuma habilidade para transformação de oxiHb em metaHb. A forma de spin baixo desses espectros pode ser devido a ligação de ligantes endógenos ao ferro da heme.

Em geral componentes orgânicos e sais da série de anions de Hofmeister, que tendem a solubilizar as proteínas, diminuem  $T_x$  e favorecem a desnaturação da oxiHb. Sais de anions que precipitam as proteínas não desnaturam oxiHb ou metaHb em qualquer concentração a temperatura ambiente, ao invés disso tais sais aumentam  $T_x$  e protegem contra a desnaturação.

A desnaturação de COHb por uréia e GuHCl em função da concentração do reagente foi estudada por medidas do coeficiente de sedimentação [51]. O aumento da concentração da uréia até 8 M leva a um valor do coeficiente de sedimentação característico de uma molécula composta por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ , que corresponde ao estado final da desnaturação por uréia, sendo a reação reversível.

A desnaturação por GuHCl, embora semelhante a causada por uréia, ocorre com mudanças maiores e mais rápidas. Com concentrações de GuHCl de 0,7 M a molécula de Hb já atinge o estado final observado na desnaturação por uréia. Com concentrações de 0,7 a 2,5 M não existe alteração da molécula. Com o aumento da concentração as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  se separam antes da molécula atingir um estado no qual a heme está separada da globina.

#### 3.4.4 Desnaturação por detergentes

O efeito de detergentes (duodecil sulfato de sódio (SDS) e salicato de sódio) no espectro de NOHb no estado R é mostrado na figura 3.3 [3].

Com o aumento das concentrações dos detergentes o pico em  $g = 1,986$  decresce e aparece um tripleto hiperfino com centro em  $g = 2,009$  e um pico em  $g = 2,094$ . O estado final desta etapa é estável em uma certa faixa de concentração (6,7 a 200 mM para SDS e 0,5 a 0,7 M para salicato de sódio). O comportamento do sinal foi explicado como devido a uma perda da conformação proteica devido aos efeitos combinados das atrações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas dos detergentes e da proteína.

A forma do espectro mostra que a molécula mantém a simetria rômbrica em torno do centro paramagnético. Concentrações superiores a 200 mM de SDS e 0,7 M de salicato de sódio levam a uma nova transformação no sinal, passando a apresentar uma forma característica de uma molécula com simetria axial. Portanto o tratamento da proteína com altas concentrações de detergentes tem como efeito eliminar a diferença que existia entre os dois valores de  $g$  no plano  $xy$ .

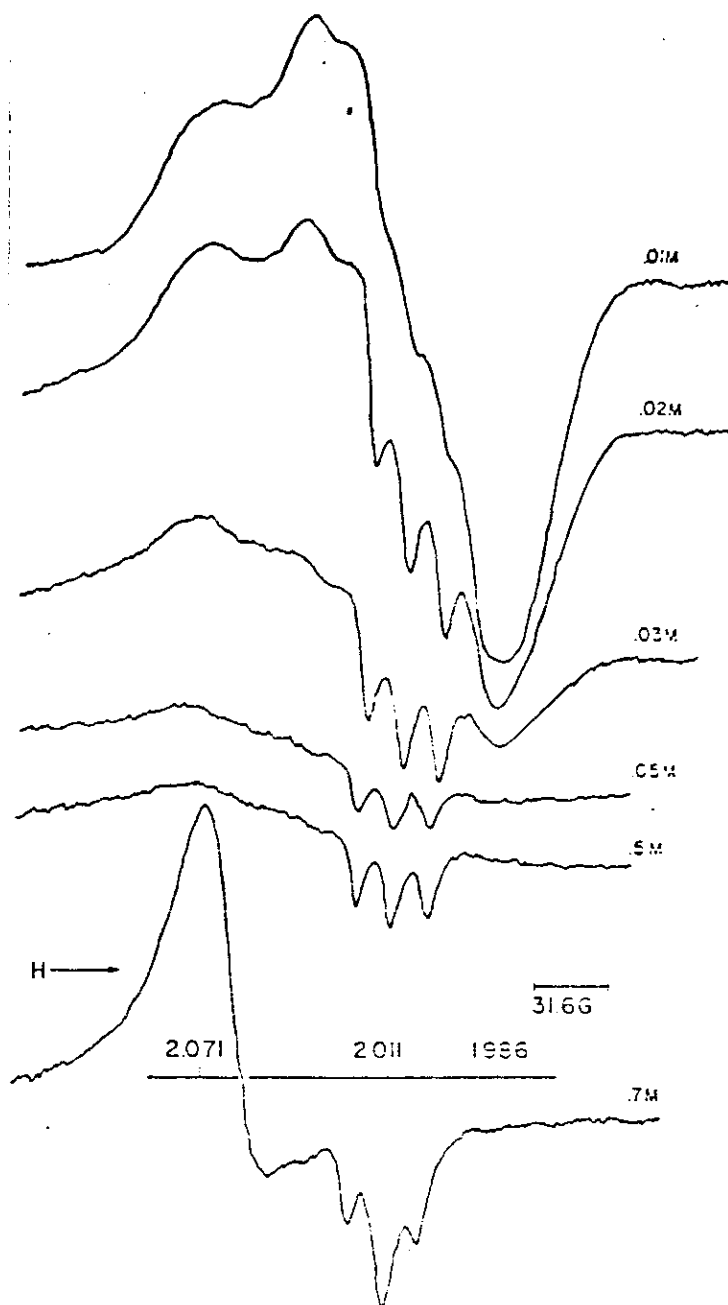


Figura 3.3: Espectros de RPE de NOHb desnaturada por detergentes

# Capítulo 4

## Materiais e métodos

### 4.1 Preparação de amostras

Sangue humano foi coletado em heparina (anti-coagulante) e as hemácias foram lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. As células empacotadas foram hemolizadas com água destilada e clorofórmio (concentração final de clorofórmio: 10%). Depois de 18 hs a solução foi centrifugada e as moléculas de Hb retiradas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em solução com 50% de glicerol v/v em tampão Tris pH 8,5.

Para retirar o glicerol da solução de Hb e ajustar o pH dois procedimentos foram utilizados, dependendo do volume da amostra. Para pequenas quantidades usamos colunas de filtração (Sephadex G-25, Sigma Co.) equilibradas com tampão fosfato pH 7 e força iônica 0,15(M/15), e para grandes quantidades (mais de 5 ml), que saturam as colunas, a retirada do glicerol foi feita através de diálise a  $4^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 12 horas.

Para determinar as concentrações de ferro das amostras, uma pequena quantidade (0,1 ml) de Hb foi transformada em cianometahb, usando KCN 1M e  $K_3[Fe(CN)_6]$  1M

em excesso. A concentração em mM Fe foi então determinada pela relação

$$[Fe] = \frac{A_{540} f}{\epsilon l}$$

onde:

$l = 1,0\text{cm}$  é o caminho ótico, largura da cubeta.

$\epsilon = 11,0$  é o coeficiente de extinção molar.

$f$  é o fator de diluição, volume de  $H_2O$  mais volume de Hb/volume de Hb.

$A_{540}$  é a absorção ótica em 540 nm, banda característica de cianometaHb [52], obtida usando um espectrofotômetro Cary modelo 17.

MetaHb foi preparada usando como agente oxidante  $K_3[Fe(CN)_6]$  com concentração igual a 5 vezes a concentração de Fe, e depois retirado o excesso através de diálise.

N-etil-maleimida (NEM) é usada em amostras de Hb para bloquear o grupo SH e evitar sua ligação ao átomo de ferro durante qualquer processo que altere a estrutura da globina.

NEM foi adicionada em excesso às amostras de metaHb, em concentração igual a 10 vezes a concentração de Fe, deixando reagir durante aproximadamente 12 horas. O excesso foi retirado através da centrifugação em colunas de Sephadex G-25.

MetaHb foi desidratada através da liofilização das amostras usando o liofilizador Labconco modelo 75200 do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

NOHb foi preparada através da reação do gás NO (obtido da reação de ácido nítrico com cobre metálico) com a solução de Hb desoxigenada em um tonômetro. A adição do NO foi feita em atmosfera anaeróbica ( $N_2$ ) usando uma caixa de luvas.

Hematina é solúvel em soluções concentradas de KOH, pH maior que 10. A amostra em solução foi transformada para o estado férrico  $Fe^{3+}$  usando  $K_3[Fe(CN)_6]$ . O pH foi então, ajustado para 7 adicionando HCl. Após a precipitação, a amostra foi filtrada a vácuo e seca em um dessecador, contendo pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), no qual foi feito vácuo.

## 4.2 Técnica experimental

As amostras foram tratadas termicamente usando o banho ultratermostático modelo Fanen-111, que mantém a temperatura estável e uniforme com erro de  $1^\circ C$ .

As amostras demoram um período de tempo muito pequeno ( $\simeq 1min$ ) para atingir a temperatura e entrar em equilíbrio com o banho. As amostras em equilíbrio com o banho serão consideradas como tendo tempo de tratamento térmico igual a zero.

Depois de atingir o equilíbrio as amostras foram retiradas do banho em tempos diferentes e resfriadas rapidamente em vapor de  $N_2$  líquido para evitar que o processo de desnaturação prosseguisse.

Medidas de RPE foram feitas utilizando um espectrômetro banda-X modelo Varian E-9 com uma cavidade retangular Bruker. As condições de medidas foram: amplitude de modulação 16G, potência de microonda 200 mW e temperatura  $80 \pm 2K$ .

As medidas de temperatura foram feitas usando um termopar Chromel-constantan e o resfriamento das amostras foi obtido através de fluxo controlado de  $N_2$ . Um evaporador de  $N_2$  líquido foi construído, constituído de duas resistências: uma de  $75\Omega$  para evaporar o  $N_2$  e outra sensível a mudanças de temperatura para controle do nível de  $N_2$  líquido.

Para temperaturas próximas a 77K, a temperatura é estabilizada com uma variação de  $\pm 2K$ , com controle do fluxo de gás, obtido usando a potência adequada na resistência do evaporador. Mesmo que a temperatura varie de até 4K, nesta faixa de temperatura a variação da intensidade do sinal de RPE é desprezível.

Os espectros foram digitalizados usando a mesa digitalizadora Digigraf, modelo da Vinci, acoplada a um microcomputador utilizando o programa *digital* (cedido pelo IFQSC-USP). Posteriormente o programa *epranala V 3.52* (Copyright J. Rowhtree, P. Fayer & B. Benne) foi utilizado para igualar as condições experimentais, combinar espectros, mudar os números de pontos, etc. O espectro resultante do programa *digital* apresenta duas colunas e não indica o número de pontos, enquanto que o formato para o *epranala* é uma coluna e com o número de pontos indicado. Para mudar o formato do espectro foi desenvolvido um programa *formdec* (cedido por Antônio Carlos Bruno, Departamento de Física da PUC-RJ).

Como os espectros foram tomados como primeira derivada da absorção foi feito um programa em linguagem fortran (apêndice A) para calcular numericamente (regra do trapézio) o valor da área do sinal de absorção (segunda integral do sinal) que é proporcional ao número de spins. Este programa também corrige a linha de base, igualando os valores inicial e final da ordenada do espectro, subtraindo deste uma reta com inclinação adequada. O resultado desta correção é mostrado na figura 4.1.

Nos picos dos sinais ou em sinais onde a largura de linha é muito pequena o cálculo numérico pela regra do trapézio apresenta um erro maior do que em outras regiões do sinal, porque uma área maior do sinal será desprezada. No caso de NOHb este erro

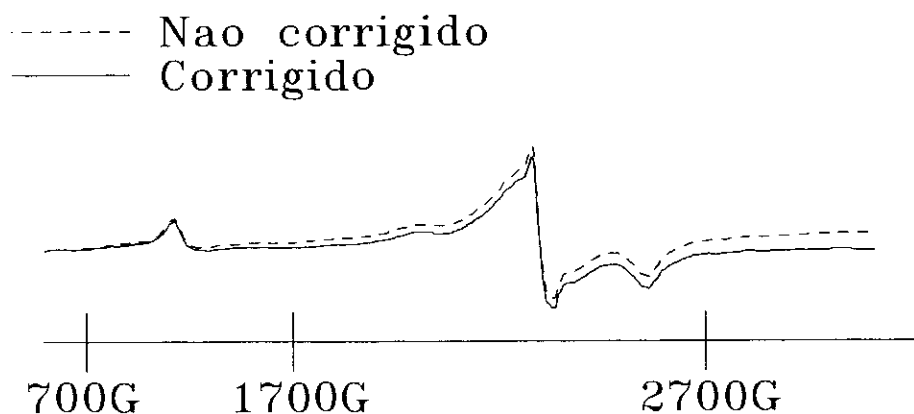


Figura 4.1: Resultado da correção da linha de base e intervalo do campo magnético onde são calculadas as áreas.

pode ser ainda maior quando o tripleto hiperfino está presente. Para obtermos uma estimativa do erro a integral foi feita com números de pontos diferentes (512, 1024 e 2048). Os resultados serão discutidos posteriormente nos gráficos que mostram a variação das áreas.

A área de cada sinal depende da probabilidade de transição em cada estado, que depende dos valores de  $g$ , entretanto como estamos interessados somente nas relações entre as áreas dos sinais nos diferentes tempos e temperaturas de tratamento térmico, este termo de correção não será considerado.

A área do sinal de metaHb foi calculada usando o intervalo de 700G a 1700G que é uma boa aproximação do valor real, uma vez que a contribuição do sinal com  $g = 2$  é muito pequena e pode ser desprezada [29]. A área do sinal de spin baixo foi obtida



entre 1700G e 3700G. Estes intervalos do campo magnético são mostrados na figura 4.1.

# Capítulo 5

## Resultados

### 5.1 Metahemoglobina

Espectros de RPE de solução de metaHb humana nativa e desnaturada termicamente a temperaturas fixas de 60°C, 70°C e 80°C variando o tempo de desnaturação são mostrados nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 respectivamente.

Os espectros apresentam uma linha em campo baixo com  $g = 6$  característica do íon  $Fe^{3+}$  com o estado de spin  $5/2$ , componente perpendicular ao eixo de simetria, isto é, paralela ao plano da heme [53].

Em campos altos são observados para amostra desnaturada os sinais com:  $g = 2,9 \pm 0,1$ ,  $g = 2,45$ ,  $g = 2,27$ ,  $g = 1,91$  e  $g = 1,85$  característicos do estado de spin baixo  $S = 1/2$  de  $Fe^{3+}$  [15].

Na amostra nativa aparece um sinal muito pouco intenso e alargado na região próxima de  $g=2$  que pode ser devido a uma pequena quantidade ( $\simeq 20\%$ ) de amostra desnaturada ou na forma hidroxihb ( $g=2,54$ ,  $2,18$  e  $1,85$ ).

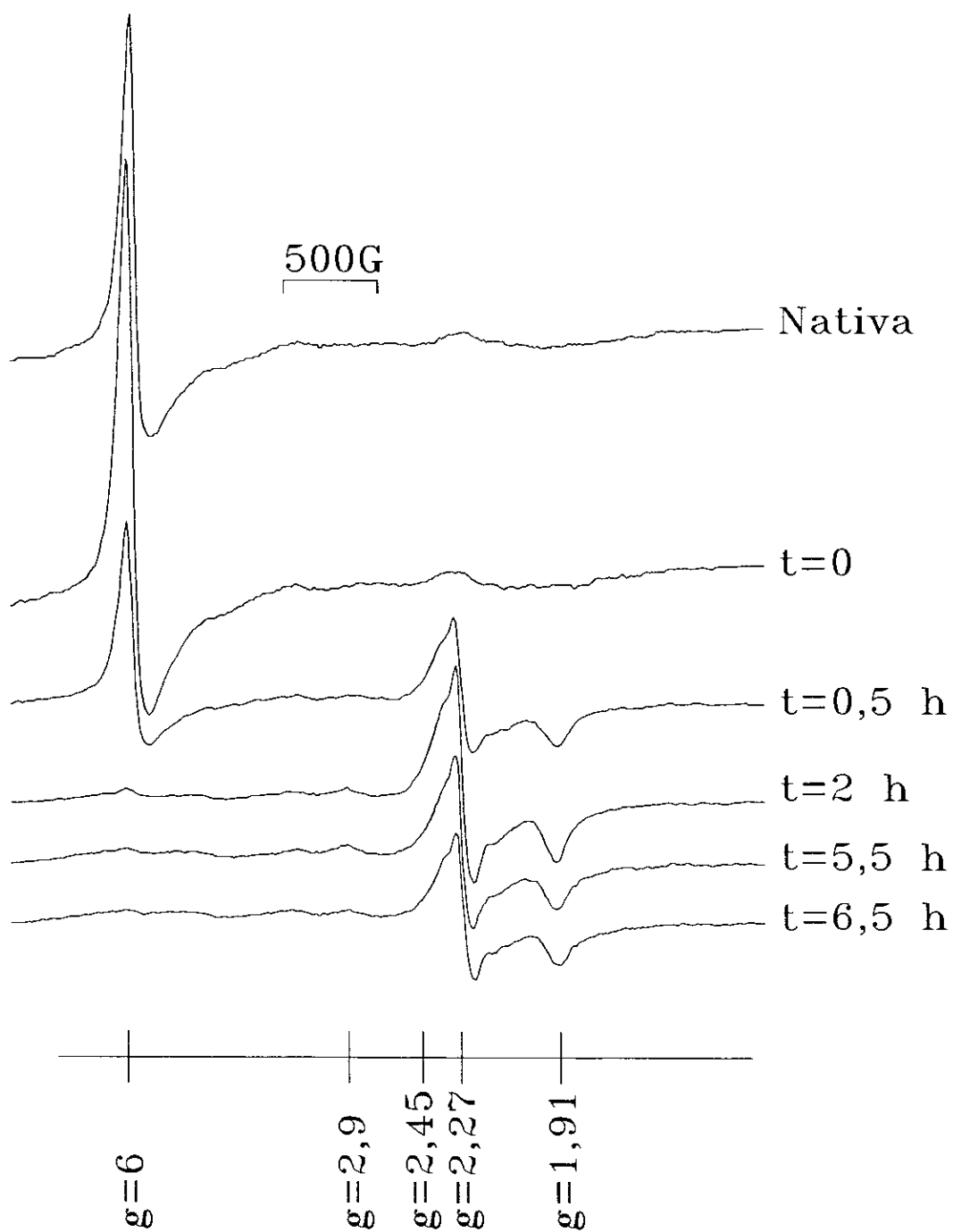


Figura 5.1: Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 60°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho:2000

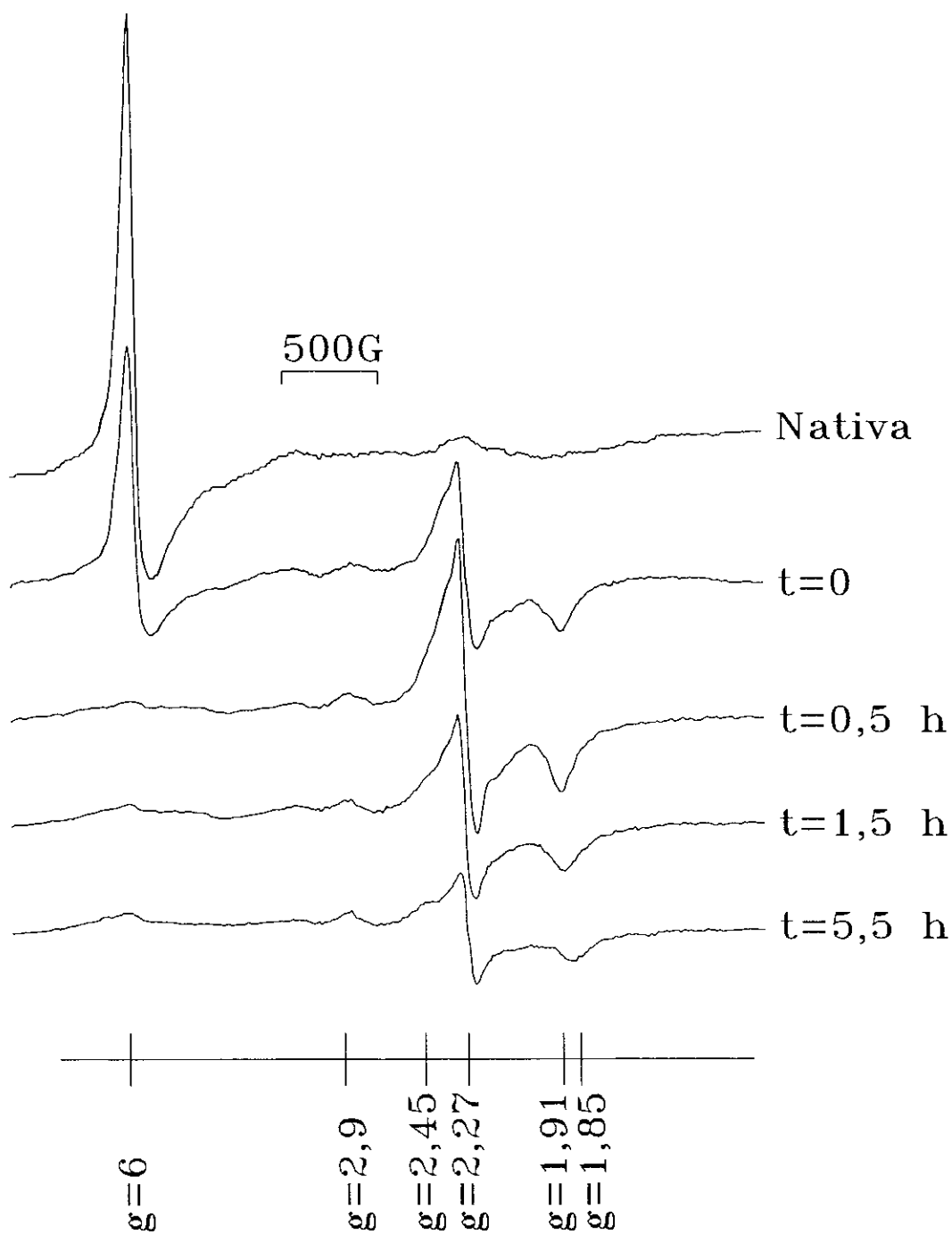


Figura 5.2: Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 70°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 2000

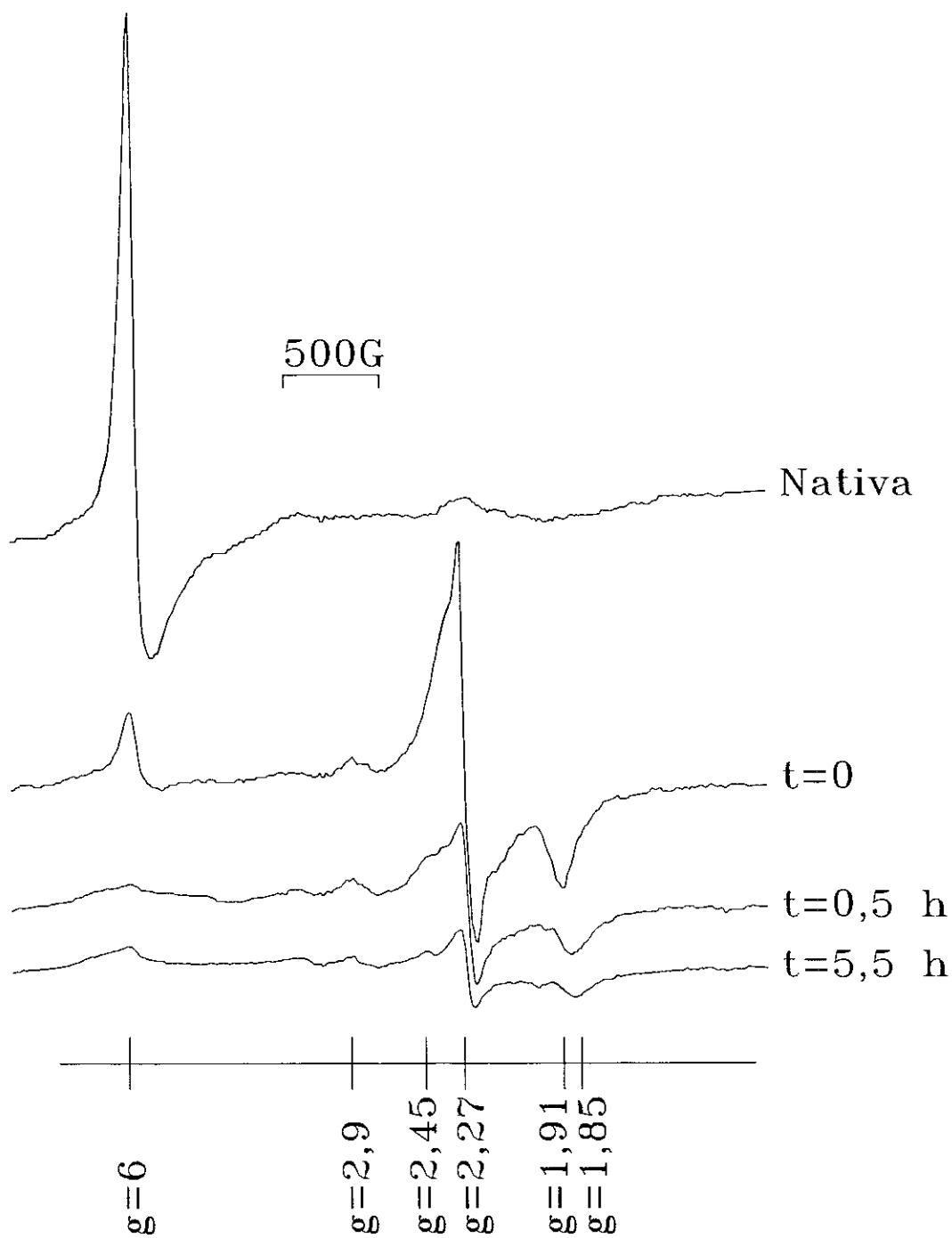


Figura 5.3: Espectros de RPE de solução de metaHb desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 2000

A forma dos espectros apresenta aproximadamente o mesmo comportamento nas três temperaturas estudadas: inicialmente uma diminuição da intensidade do sinal com  $g=6$  e aparecimento do sinal de spin baixo, com  $g=2,27$  e  $1,91$  com maiores intensidades, e depois mudanças na forma do sinal de spin baixo com diminuição das intensidades de  $g=2,27$  e  $1,91$ , aparecimento de  $g=2,45$  e  $1,85$  e aumento de intensidade de  $g=2.9 \pm 0,1$ .

Em geral as mudanças observadas nos espectros de todas séries são reproduzidas, com exceção do aparecimento (algumas vezes) de um sinal com  $g=4,3$  que é devido ao íon  $Fe^{3+}$  estado de spin  $5/2$  com simetria rômbrica, razão  $E/D = 0,33$  [54].

A variação da área total do sinal, de spin alto e de spin baixo é mostrada na figura 5.4. As linhas são para facilitar a visualização do comportamento em cada temperatura. O erro calculado como descrito no capítulo 4 é muito pequeno ( $\simeq 1\%$ ) e não é mostrado.

A variação da área do sinal com  $S = 5/2$  é mostrada na figura 5.4a. Observa-se que para  $T = 60^\circ\text{C}$  esta área inicialmente cresce e depois decresce até um valor aproximadamente constante. Para  $T = 70^\circ\text{C}$  e  $T = 80^\circ\text{C}$  o crescimento inicial não é observado e o decréscimo é mais rápido para temperaturas de desnaturação mais altas, isto é, o tempo para a área variar até 50% do valor da nativa é menor para temperaturas maiores.

A área do sinal de spin baixo (figura 5.4b) inicialmente cresce, apresenta um máximo, em um tempo que é maior para temperatura de desnaturação menor, e depois decresce até um valor de equilíbrio.

A área total do sinal de RPE (figura 5.4c), soma das áreas do sinal com spin alto e baixo, indica uma diminuição do número total de centros paramagnéticos, com exceção

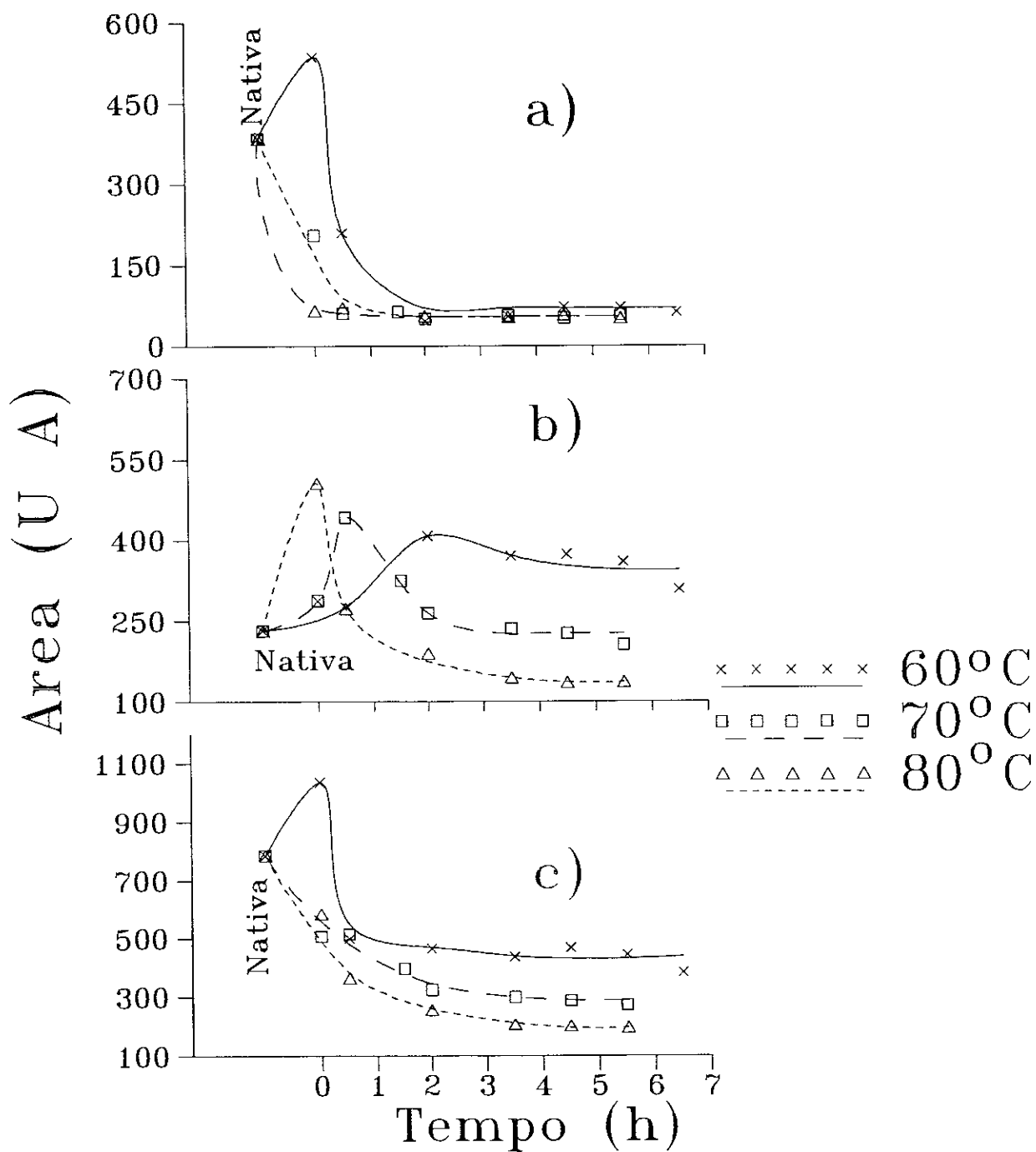


Figura 5.4: Variação das áreas dos sinais de solução de metaHb

a)spin alto b)spin baixo c)área total

de um aumento inicial em  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , causado pelo aumento da área do sinal de spin alto.

O aumento inicial em  $T = 60^{\circ}\text{C}$  da intensidade e da área do sinal com  $g = 6$  é devido a uma pequena quantidade de amostra nativa que estava na forma de oxiHb e que se transforma em metaHb, como observado no processo de desnaturação térmica de oxiHb [1]. Em temperaturas maiores ( $70^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ ) esta etapa já está concluída em  $t=0$ . Também em medidas feitas com amostras sem oxiHb esta etapa não foi observada.

As áreas apresentam um valor final de equilíbrio. Este valor para a área de spin alto é igual nas três temperaturas e para a área de spin baixo e total é maior para temperaturas menores.

A variação da forma e da área dos espectros indica a existência de duas etapas durante o processo de desnaturação térmica de metaHb.

A primeira etapa é caracterizada pela diminuição da intensidade do sinal de  $g = 6$  e aparecimento do sinal com spin baixo. As características das áreas desta etapa são: diminuição da área do sinal com  $g = 6$  e total e crescimento da área do sinal de spin baixo.

A segunda etapa é caracterizada por mudanças na forma do sinal de spin baixo como descrito anteriormente e a área dos sinais apresenta as seguintes características: a área do sinal com  $g = 6$  é praticamente constante e a área do sinal de spin baixo e total diminuem.

Desta forma, definiremos o tempo de transição da primeira para a segunda etapa,  $t_x$ , que depende da temperatura de desnaturação, como o tempo necessário para a área



do sinal de spin baixo apresentar um máximo ou para a área do sinal com  $g = 6$  ser igual ao valor mínimo.

O valor de  $t_x$  para  $T = 80^\circ\text{C}$  é muito pequeno e em  $t=0$  o sinal já apresenta características da segunda etapa, para  $T = 70^\circ\text{C}$  é  $0,5h$  e em  $T = 60^\circ\text{C}$  os gráfico das áreas mostram que  $t_x = 2h$ , apesar de nos espectros não se observar a mudança da forma até  $t = 6,5h$ .

As mudanças na forma dos espectros de spin baixo e a observação de diferentes espécies e transformações de uma espécie em outra durante a desnaturação por outros métodos [13] sugerem que isso também pode acontecer com as amostras desnaturadas termicamente.

Com essas observações, somos levados a considerar, inicialmente, que existem somente duas espécies, associadas as duas etapas do processo, e as mudanças no espectro seriam devidas à transformação de uma espécie em outra. Como os sinais de campo mais alto e mais baixo são largos, as duas espécies seriam facilmente identificadas como hemicromo P(  $g = 2,45, 2,27$  e  $1,91$ ) e H( $g = 2,85, 2,27$  e  $1,65$ ). Estas estruturas aparecem na desidratação da proteína e com a evaporação da água pelo aquecimento poderiam ser também formadas com o tratamento térmico.

O espectro da segunda etapa com  $T = 80^\circ\text{C}$  e  $t = 3,5h$  teria uma maior contribuição do espectro de P e pouco de H e o espectro da primeira etapa com  $T = 70^\circ\text{C}$  e  $t = t_x$  o contrário, ou seja, maior contribuição de H e menor de P. Os espectros das espécies puras foram obtidos da subtração entre diferentes proporções dos espectros normalizados de cada etapa, de maneira a zerar uma das componentes característica de cada espécie

( $g=1,91$  e  $2,9$ ).

Entretanto não é possível reproduzir os espectros de toda série combinando diferentes proporções dos espectros resultante deste tratamento. A combinação foi feita subtraindo dos espectros da série diferentes proporções dos espectros das espécies de modo a zerar a intensidade dos sinais. As proporções das espécies que zeram as linhas de campo mais alto e mais baixo é diferente das proporções que zeram as linhas em  $g = 2,27$  e  $2,45$ .

Portanto fomos levados a hipótese de existência de mais espécies e de que mesmo os espectros característicos de cada etapa seriam resultante da combinação de espécies diferentes.

Usando ainda a hipótese que uma destas espécies é o hemicromo P que tem como sexto ligante do ferro uma cisteína [17], pode-se bloquear este resíduo com o marcador N-etil-maleimida (NEM). Podemos então obter os espectros das outras espécies comparando os espectros das amostras marcadas e não com NEM e tratadas termicamente com o tempo e a temperatura característicos de cada etapa.

O resultado é mostrado na figura 5.5 onde nota-se na amostra tratada a  $T = 70^\circ\text{C}$  e  $t = t_x$  a existência do sinal com  $g = 2,45$  e  $g = 1,91$  mesmo após a ligação com NEM. Como estes valores de  $g$  são característicos da ligação de uma cisteína na 6ª posição, durante a desnaturação térmica outras cisteínas além da  $\beta 93$ , que é a única acessível no estado nativo, podem se ligar ao ferro.

A continuação do processo de desnaturação desliga primeiro as outras cisteínas do que a  $\beta 93$ , como é visto pelos espectros a  $80^\circ\text{C}$  e  $t = 3,5h$ . Na amostra não tratada com NEM o espectro apresenta valores de  $g$  característicos da ligação com cisteína enquanto

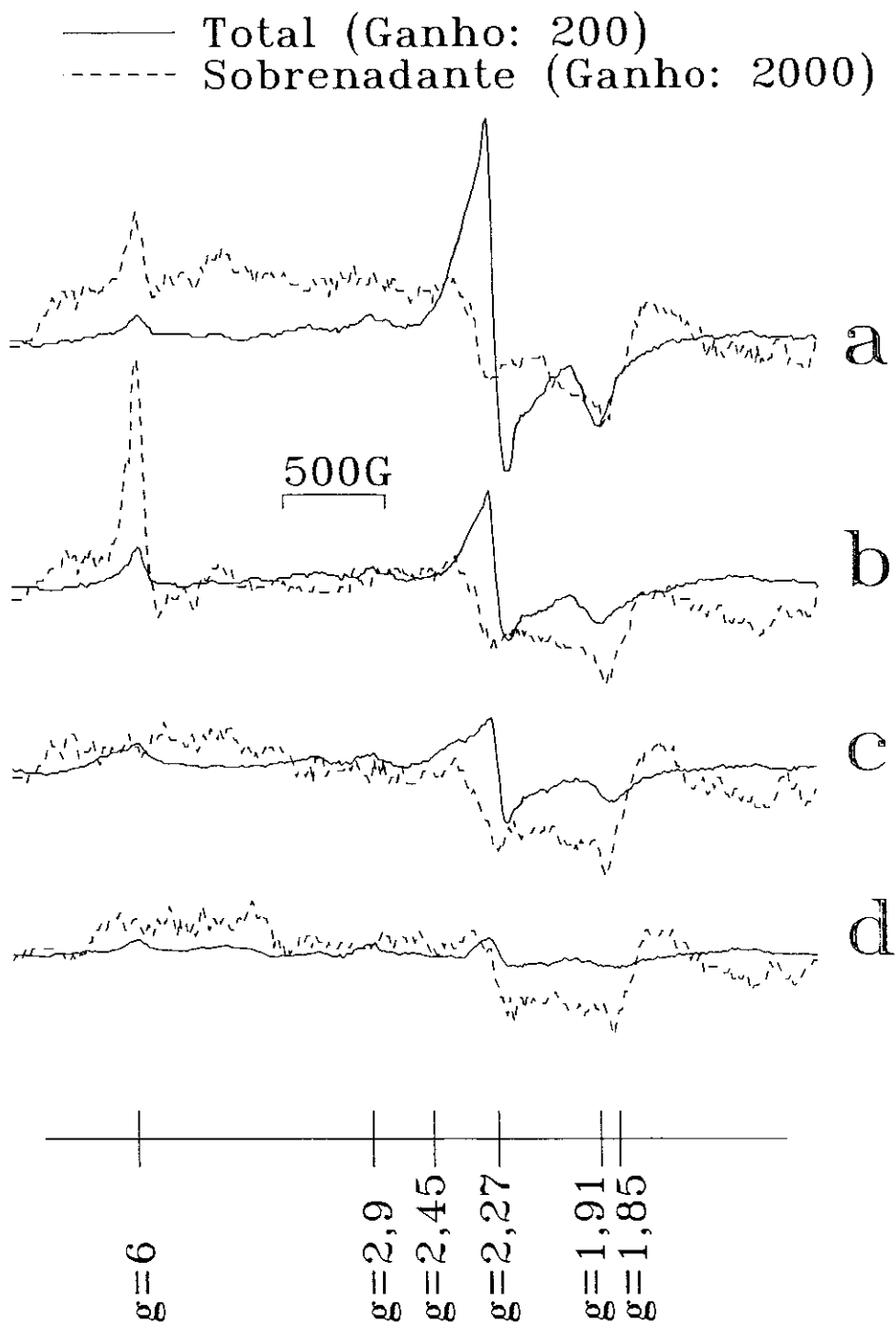


Figura 5.5: MetaHb desnaturadas termicamente a  $T = 70^{\circ}\text{C}$  e  $t = t_x$  sem NEM (a) ou com NEM (b) e a  $T = 80^{\circ}\text{C}$  e  $t = 3,5h$  sem NEM (c) ou com NEM (d).

que na amostra com NEM estes valores de  $g$  não aparecem.

O espectro das amostras da segunda etapa pode ser constituído de duas espécies, uma é caracterizada pelo espectro da amostra tratada com NEM desnaturada a  $80^{\circ}\text{C}$ , mostrado na figura 5.6 - espectro A e a outra é o resultado da subtração entre os espectro da segunda fase e o espectro A. Esta segunda espécie está associada ao espectro B da figura 5.6.

Os valores de  $g$  das linhas de campo mais baixo são determinadas com menos precisão do que os de campo mais alto. Os valores obtidos para cada espécie são A:  $2,9 \pm 0,1$ ,  $2,27$  e  $1,85$  e B:  $g=2,45$ ,  $2,27$  e  $1,91$ .

As combinações com diferentes proporções dos espectros A e B não reproduzem os sinais da primeira etapa, este fato reforça a hipótese de existência de uma terceira espécie que pode ser obtida da subtração entre os espectros desta etapa e combinações das outras duas espécies, de modo a zerar as linhas em campos mais altos ( $g = 1,85$  e  $1,91$ ). Assim obtem-se para esta espécie um espectro com  $g=2,9$  e  $2,27$  (fig. 5.6 - espectro C).

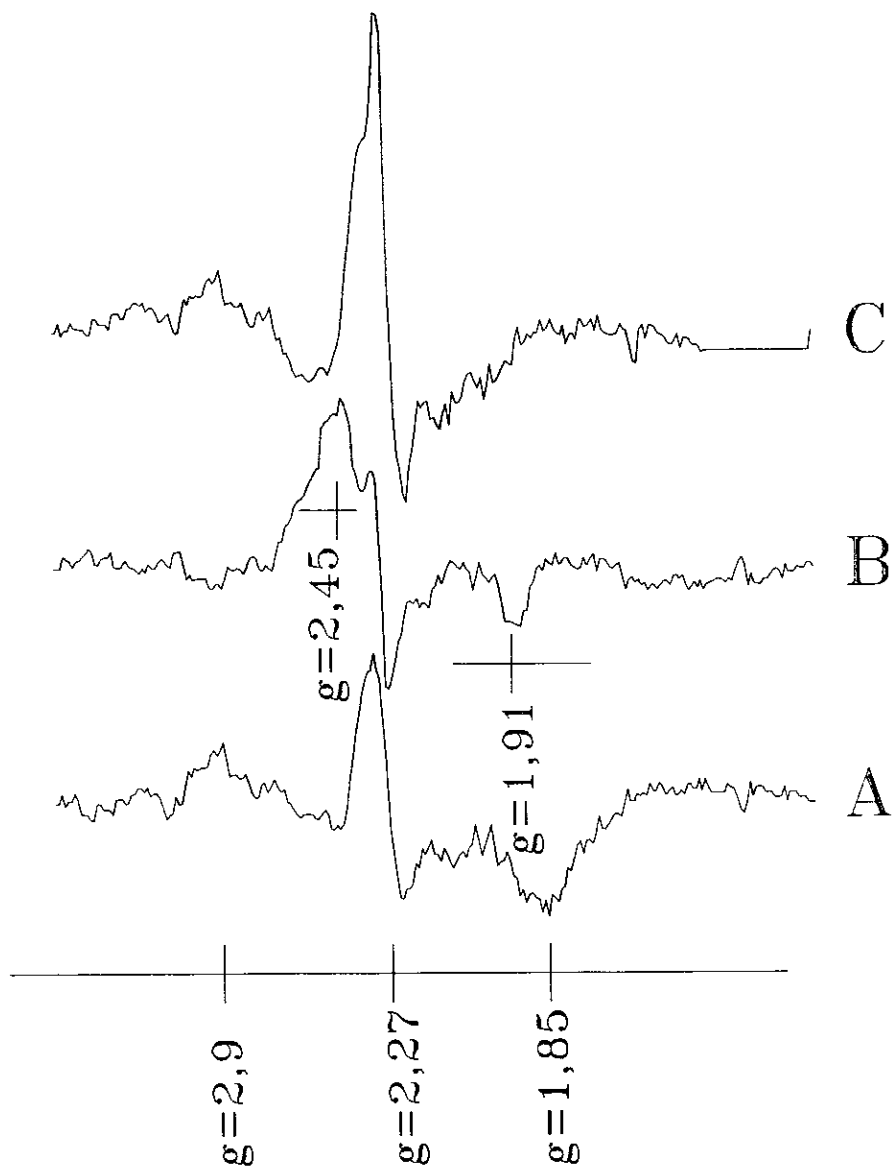


Figura 5.6: Espécies que aparecem durante a desnaturação térmica de solução de metaHb. Áreas normalizadas .

Tendo obtido os sinais das três espécies que aparecem durante a desnaturação podemos recombiná-los variando as suas proporções para reproduzir os espectros de todas séries de tratamento térmico. Na figura 5.7 são comparados alguns espectros, contruídos dessa maneira e normalizados com a mesma área total, com os espectros experimentais também normalizados.

Observa-se que os espectros construídos como combinação das três espécies e uma pequena contribuição (menos do que 10%) do sinal com  $g=6$  da amostra nativa reproduzem razoavelmente bem os espectros experimentais na região de spin baixo, enquanto que na região de spin alto a reprodução não é tão boa. Isto é devido a forma do sinal de  $g=6$  que varia durante o processo, sendo na segunda etapa muito mal resolvido e alargado, e esta variação não foi considerada na combinação dos espectros.

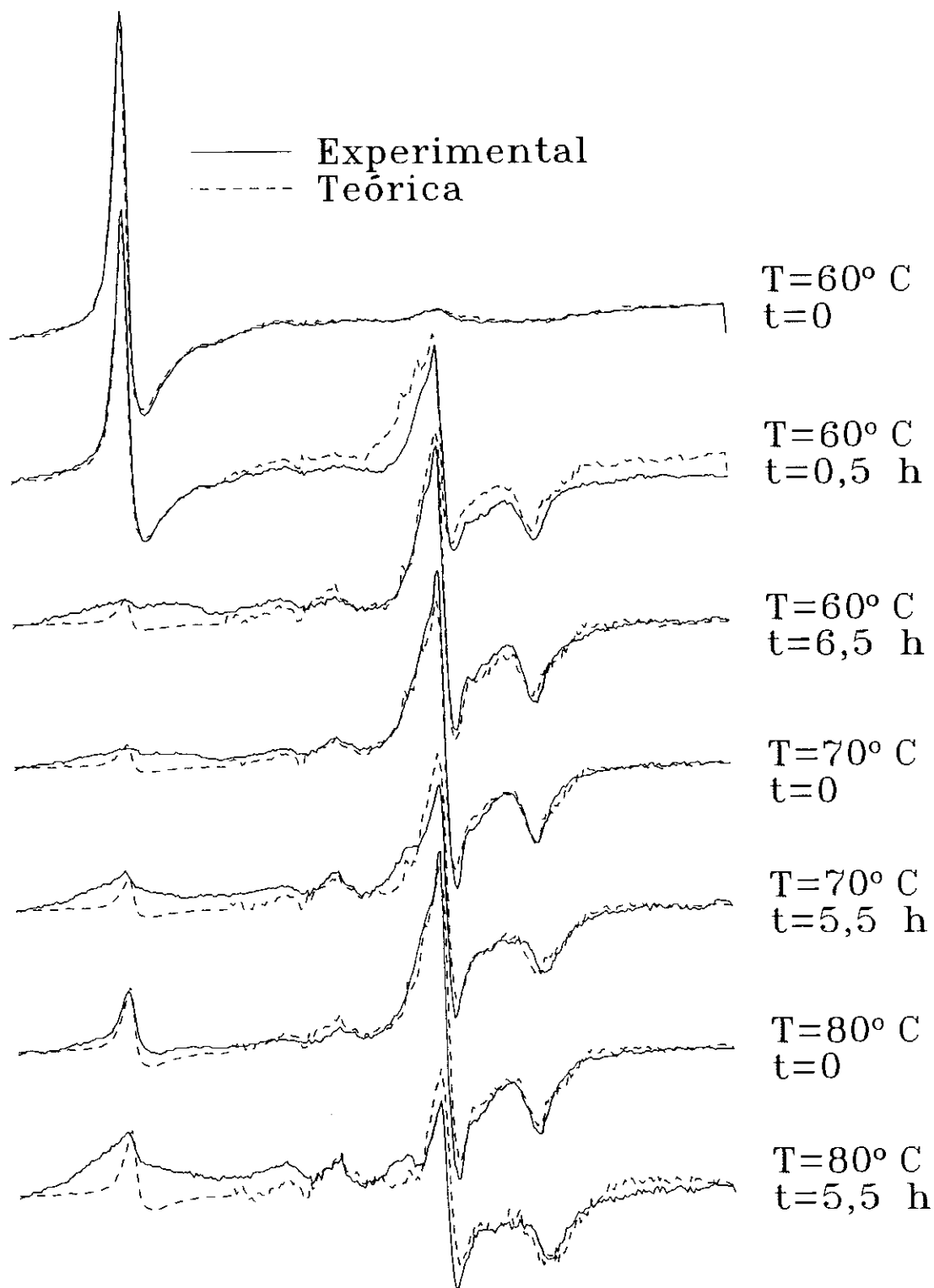


Figura 5.7: Comparação entre os espectros experimentais e obtidos pela combinação dos espectros das três espécies (A, B e C). Áreas normalizadas

A variação da proporção de cada espécie durante a desnaturação é mostrada na figura 5.8. As linhas são para melhorar a visualização do comportamento de cada espécie, que também pode ser dividido em fases com o tempo de duração dependendo da temperatura.

As espécies B e C apresentam um comportamento parecido: crescimento inicial até um valor máximo que é maior para B do que para C em qualquer temperatura, uma segunda fase caracterizada pela não variação das proporções das espécies e finalmente um decréscimo até um valor final de equilíbrio. O valor final de equilíbrio para a espécie B é zero, para C é diferente de zero e maior para temperaturas menores.

As fases observadas para a espécie C dependem da temperatura: a  $T = 60^{\circ}\text{C}$  é observado o crescimento inicial e a segunda fase, a  $T = 70^{\circ}\text{C}$  o crescimento inicial a segunda fase e diminuição até o valor de equilíbrio final e a  $T = 80^{\circ}\text{C}$  a diminuição e o valor de equilíbrio final.

Para a espécie B todas as fases são observadas nas três temperaturas, a diferença é o tempo de duração da primeira e da segunda fase que são menores para temperaturas de desnaturação maiores.

O comportamento da proporção de A é igual nas três temperaturas e caracterizado por fases em que seus valores não variam. O tempo de duração de cada fase diminui enquanto que os valores de equilíbrio aumentam com o aumento de temperatura.

As etapas do processo de desnaturação térmica anteriormente descritos pelo comportamento das áreas dos sinais podem ser relacionados com as fases do comportamento de cada espécie do seguinte modo: a primeira etapa é caracterizada pelo aumento das



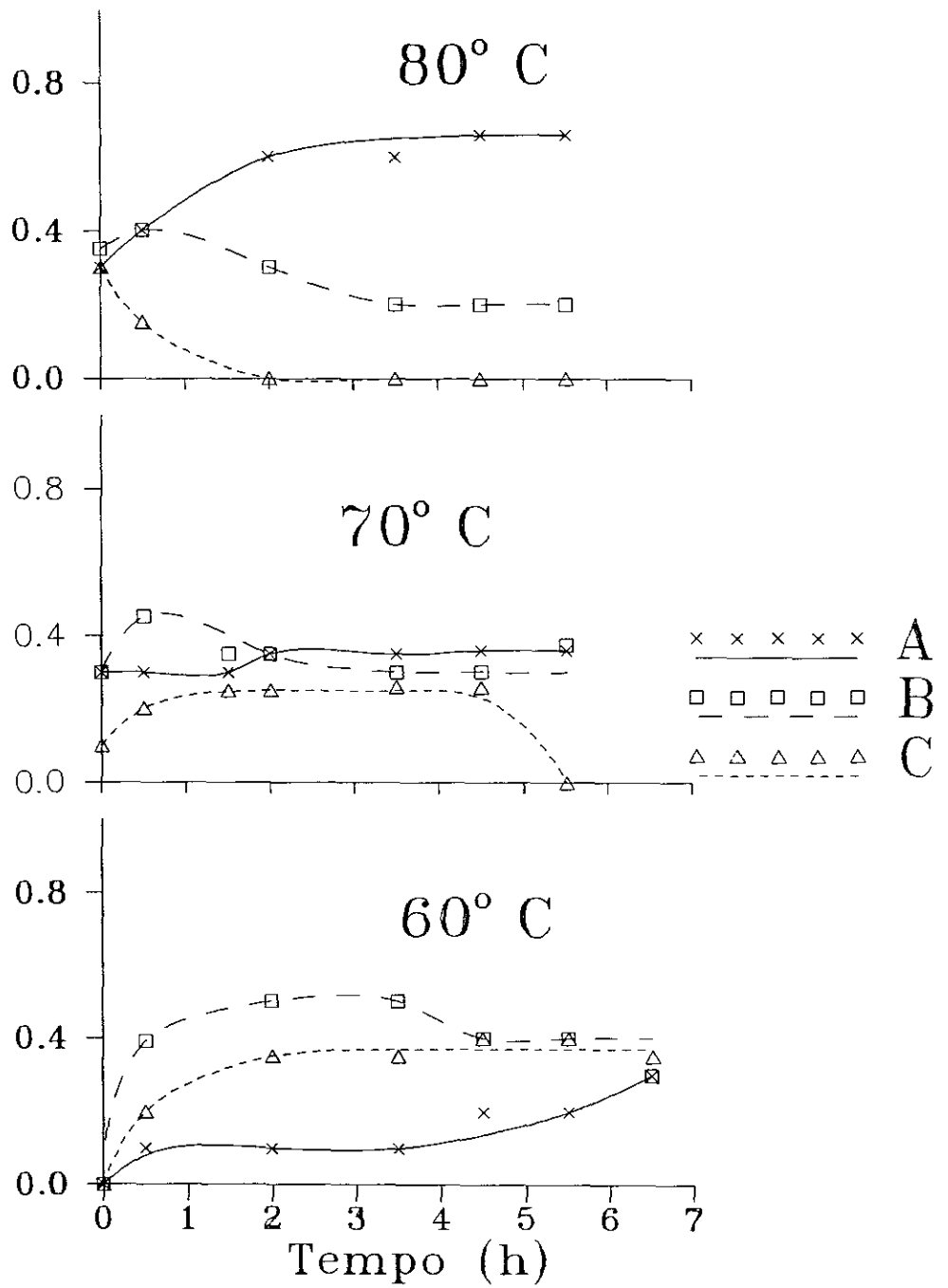


Figura 5.8: Variação das proporções de cada espécie (A, B e C) durante a desnaturação para diferentes temperaturas de tratamento térmico.

espécies B e C até seus valores máximos (fase inicial no comportamento dessas espécies) e pelo primeiro estado estável da espécie A. E a segunda etapa pelas outras fases das espécies B e C, ou seja, estabilidade no valor máximo, diminuição e estabilidade no valor mínimo, e passagem do primeiro para o segundo estado estável de A.

O comportamento das espécies nas três temperaturas nos leva a propor a seguinte sequência de reações como a mais provável para a desnaturação térmica de metaHb:



O tempo de conclusão da primeira reação (transformação de metaHb nas espécies B e C) e início da segunda (transformação de B e C em A) é aproximadamente igual a  $t_x$  determinado pela análise das áreas dos sinais, apesar de algumas amostras já terem uma fração da espécie A em tempos menores que  $t_x$ , como é observado principalmente a  $T = 70^\circ\text{C}$  ( $t_x = 0,5h$ ).

As espécies apresentam valores finais de equilíbrio (com excessão de A a  $T = 60^\circ\text{C}$  que está aumentando) que são diferentes para cada temperatura. Os valores de equilíbrio das espécies B e C diminuem com a temperatura enquanto que o de A aumenta, isto sugere que para temperaturas ou tempos maiores a segunda reação se complete, ou seja, toda a amostra se transforme na espécie A.

O processo de desnaturação térmica de soluções de Hb é caracterizado pela perda de solubilidade e precipitação das moléculas. Quanto maior o tempo de desnaturação maior é a quantidade do líquido retirado da amostra (sobrenadante). Para verificar a contribuição dos átomos de ferro paramagnéticos no sobrenadante nos espectros obti-

dos, foram feitas medidas de RPE do sobrenadante das amostras. Os espectros do sobrenadante de amostras com ou sem NEM (figura 5.5) mostram que somente em uma amostra ( $T = 70^{\circ}\text{C}$  e  $t = t_x$  com NEM fig. 5.5b) persiste uma quantidade muito pequena (o ganho do sinal do sobrenadante é 10 vezes o ganho do sinal da amostra) do ferro no estado de spin  $5/2$ . O que mostra que a quantidade de ferro no sobrenadante é muito pequena e pode ser desprezada.

## 5.2 Metahemoglobina desidratada

Durante a desnaturação térmica de Hb uma determinada quantidade de água pode ser retirada da molécula. A amostra com  $T = 80^{\circ}\text{C}$  e  $t = 5,5h$  tem grau de hidratação (estimado a partir das relações entre os volumes do sobrenadante, precipitado e inicial) aproximadamente igual a  $11 \text{ grH}_2\text{O}/\text{grHb}$  (O grau de hidratação da solução é  $18,0 \text{ grH}_2\text{O}/\text{grHb}$ ). O aparecimento dos sinais de spin baixo durante a desnaturação térmica de solução de metaHb tem características semelhantes aos hemicromos do processo de desidratação de metaHb [29]. Então, para verificar o efeito da evaporação de água no tratamento térmico em soluções foi feito um estudo do comportamento do espectro de RPE durante o tratamento térmico de metaHb totalmente desidratada (liofilizada).

Os espectros de RPE das amostra desidratada e tratada termicamente a temperaturas fixas de  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$  são mostrados nas figuras 5.9, 5.10 e 5.11 respectivamente.

São observados os sinais com  $g = 6$ ,  $g = 2,45$ ,  $g = 2,27$  e  $g = 1,91$  que são os mesmos observados nas amostras em solução e discutidas na seção anterior. Entretanto os sinais com  $g = 1,9$  e  $2,95$ , que estão presentes nos espectros de solução, não são

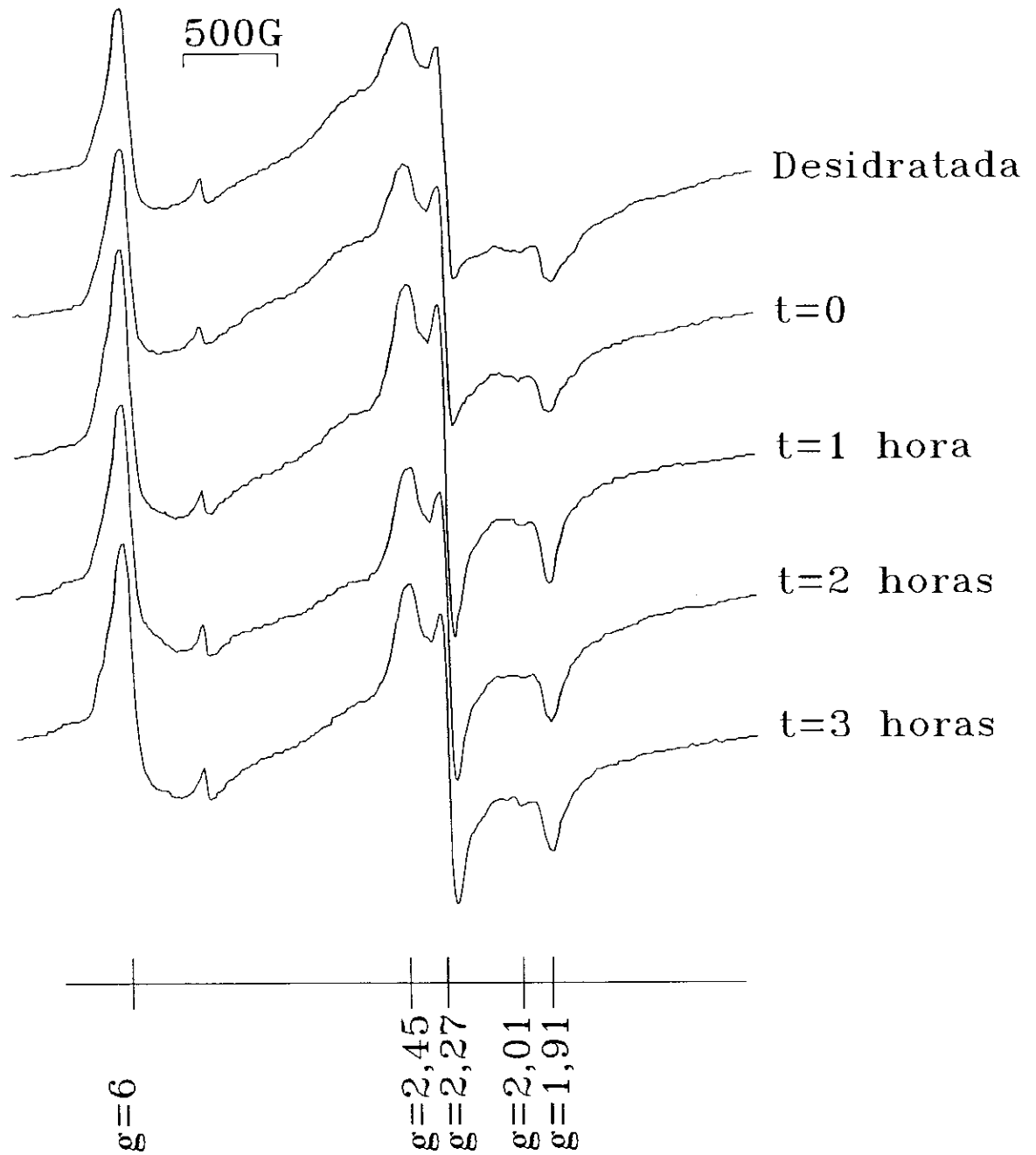


Figura 5.9: Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 60°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200

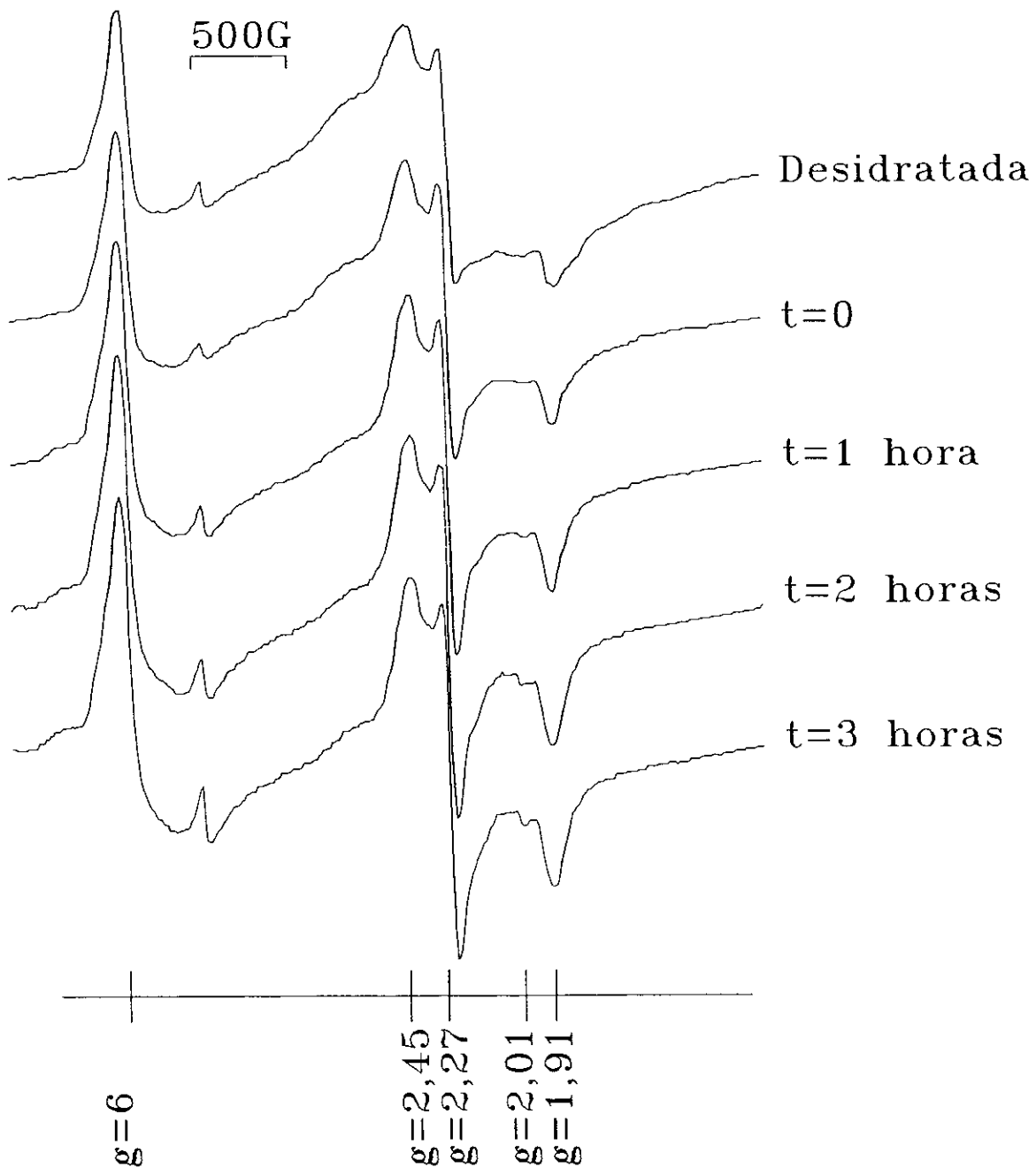


Figura 5.10: Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 70°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200

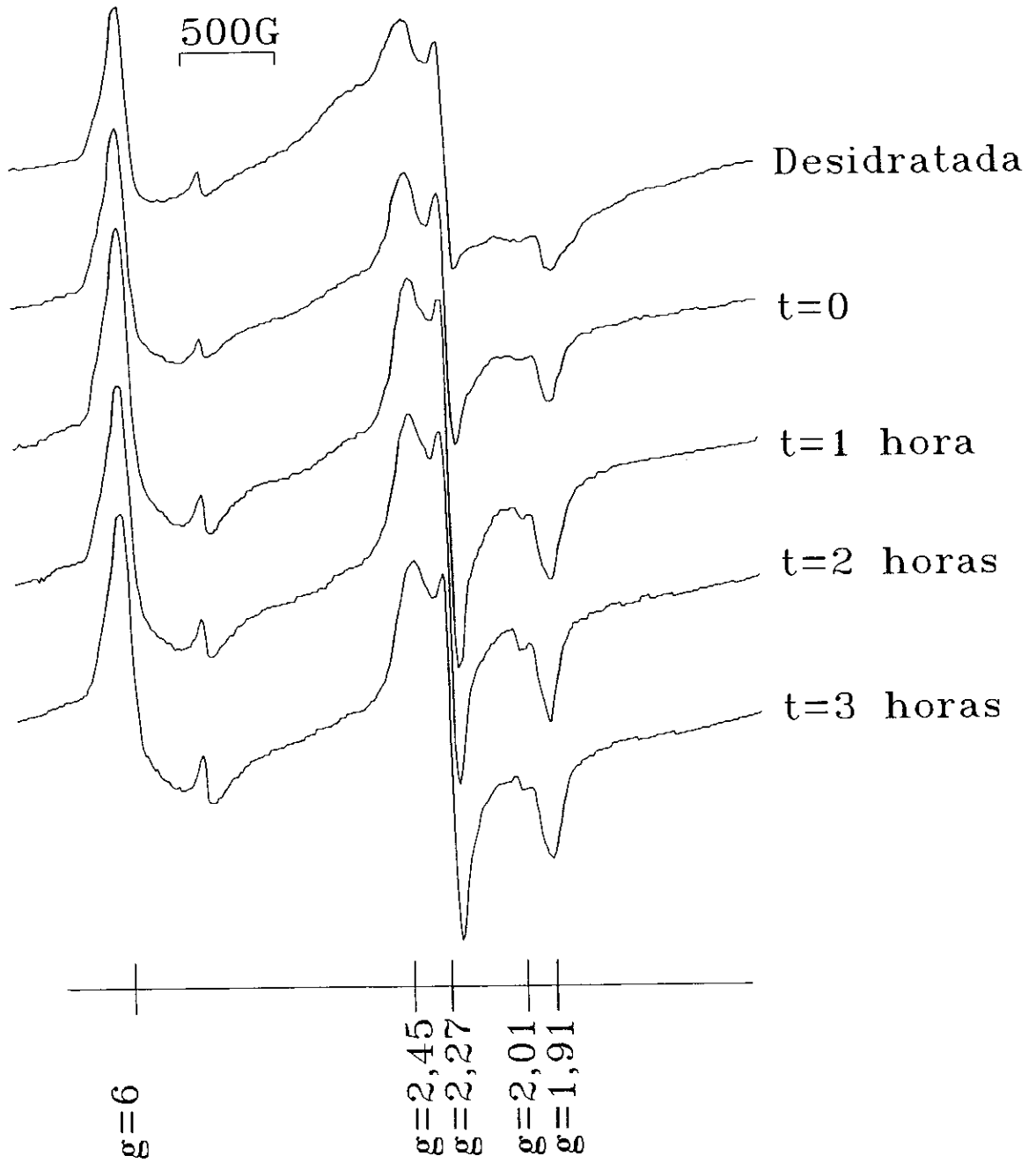


Figura 5.11: Espectros de RPE de metaHb desidratada e tratada termicamente a 80°C com tempos de tratamento diferentes. Ganho: 200

observados.

No processo de desidratação de metaHb aparece um radical livre caracterizado pelo sinal com  $g = 2,01$ . Observa-se ainda um alargamento do sinal de  $g=6$  e a formação dos hemicromos H e P [29]. Estas espécies e o estado de spin alto, que não se transformam nelas, são estáveis durante o tratamento térmico, como é visto pela pouca variação da forma dos espectros e intensidades dos sinais.

Os sinais dos hemicromos, que aparecem no processo de desidratação, tem os mesmos valores de  $g$  que as espécies B e C, que aparecem durante a desnaturação de soluções de metaHb, entretanto o espectro de spin baixo de amostras de metaHb desidratadas não sofre alteração durante o tratamento térmico, enquanto que o de solução de metaHb se altera e passa a apresentar uma terceira espécie (A).

O aparecimento do sinal do radical livre para amostras com tempos de desnaturação maiores ( 3 horas para  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , 2 horas para  $T = 70^{\circ}\text{C}$  e 1 hora para  $T = 80^{\circ}\text{C}$  ) mostra que nestas condições, as amostras de metaHb passam a uma hidratação inferior a 10% de água, caracterizada pela linha de  $g = 2,01$  [29].

A variação da área total, do sinal com spin alto e hemicromos é mostrada na figura 5.12 que reflete sua pouca intensidade em relação àquelas ocorridas em solução de metaHb(fig. 5.4). A escala dos eixos  $y$  na fig.5.4 é duas vezes menor do que na fig.5.13.

As linhas na fig.5.12 são para melhor visualização do comportamento das áreas e o erro é novamente muito pequeno e não está indicado. As pequenas variações das áreas em relação as das áreas de solução mostram que as amostras de metaHb desidratadas são bastante estáveis, entretanto mesmo com a pouca variação as áreas apresentam um

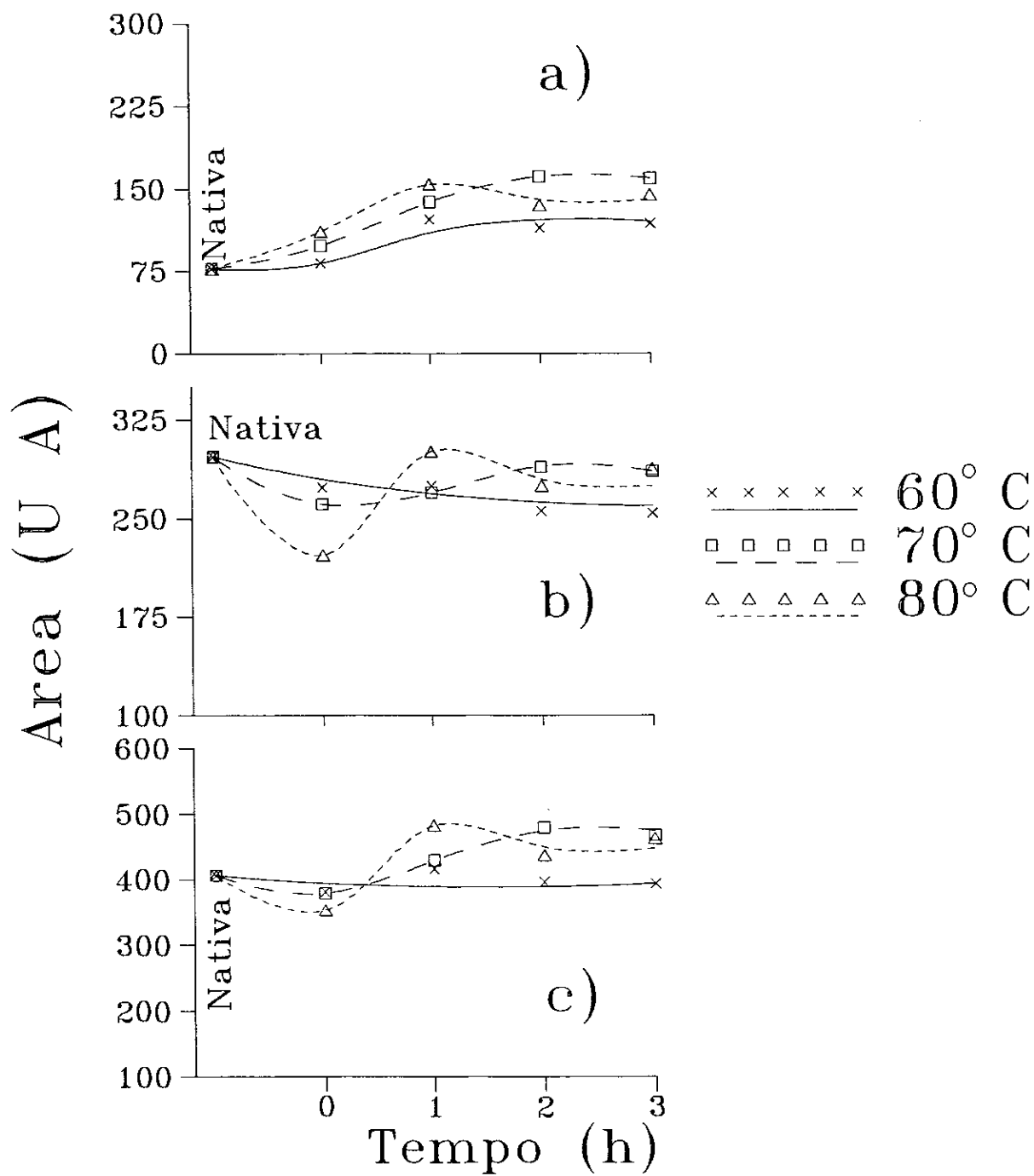


Figura 5.12: Variação das áreas dos sinais de metaHb desidratada a) spin alto b) hemicromos c) área total



comportamento que depende da temperatura.

A área de spin alto (fig 5.12a) apresenta um máximo em um tempo que diminui com o aumento da temperatura.

As áreas de spin baixo e total apresentam um comportamento semelhante caracterizado inicialmente por um valor mínimo e depois por um valor máximo. Para  $T = 60^{\circ}\text{C}$  a área de spin baixo ainda está diminuindo e a área total é praticamente constante até  $t = 3h$ .

Desse modo podemos distinguir duas fases durante o processo de tratamento térmico de metaHb desidratada e definir o tempo de transição entre elas como sendo o tempo em que as três áreas atingem seu valor máximo. Esse tempo de transição para  $T = 80^{\circ}\text{C}$  é 1 hora, para  $T = 70^{\circ}\text{C}$  é aproximadamente 2 horas e para  $T = 60^{\circ}\text{C}$  é maior que 3 horas.

Como não existe alteração da forma dos espectros nas três temperaturas as fases não estão relacionadas com mudanças de ligantes da heme. Por outro lado, o tempo de transição de uma fase para outra é aproximadamente igual ao tempo de aparecimento do radical livre, sugerindo que a transição está relacionada com uma mudança para um estado com grau de hidratação menor.

Esta hipótese é reforçada pela comparação do comportamento da área total do sinal em função do tempo de tratamento térmico (fig. 5.12c) com aquele obtido em função do grau de hidratação [29]. Durante o processo de desidratação, a área total aumenta de um fator 1,4 com a mudança de aproximadamente  $0,2 \text{ gr } H_2O/\text{gr } Hb$  para  $0,1 \text{ gr } H_2O/\text{gr } Hb$ , acompanhada do aparecimento do sinal do radical livre. Na figura

5.12c o fator é da mesma ordem ( $1,3 \pm 0,2$ ).

### 5.3 Hematina

Para verificar isoladamente as variações da estrutura do ferro do grupo heme (estado de spin e simetria) durante o tratamento térmico foram feitas medidas de RPE de hematina, uma porfirina de ferro semelhante a heme (figura 5.14), tratada termicamente a 70°C e 80°C. A hematina apresenta como 5º ligante uma molécula de OH que é substituída por  $H_2O$  como descrito no capítulo 4.

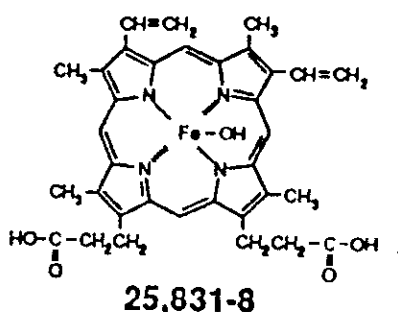


Figura 5.13: Hematina

Os espectros (figura 5.15 e 5.16) apresentam somente o sinal do ferro  $F_e^{+3}$  com spin alto e mostram muita pouca variação tanto na forma como na área (480  $\simeq$  40 U.A.- figura 5.16) que indica que não existe alterações dos ligantes, estado de spin e simetria do ferro durante o tratamento térmico na ausência da globina.

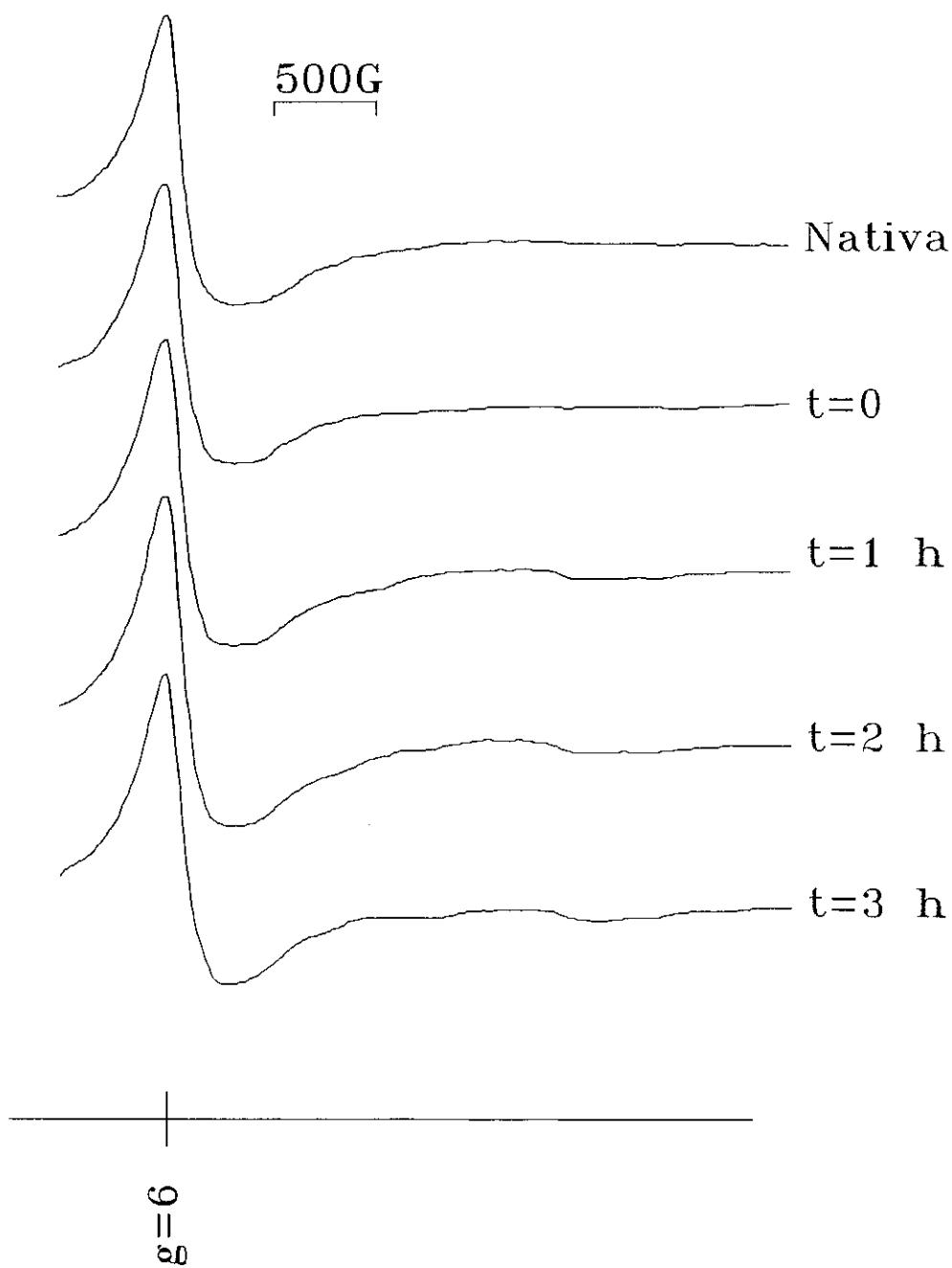


Figura 5.14: Espectros de RPE de hematina tratada termicamente a 70°C com tempos de tratamentos diferentes. Ganho: 20

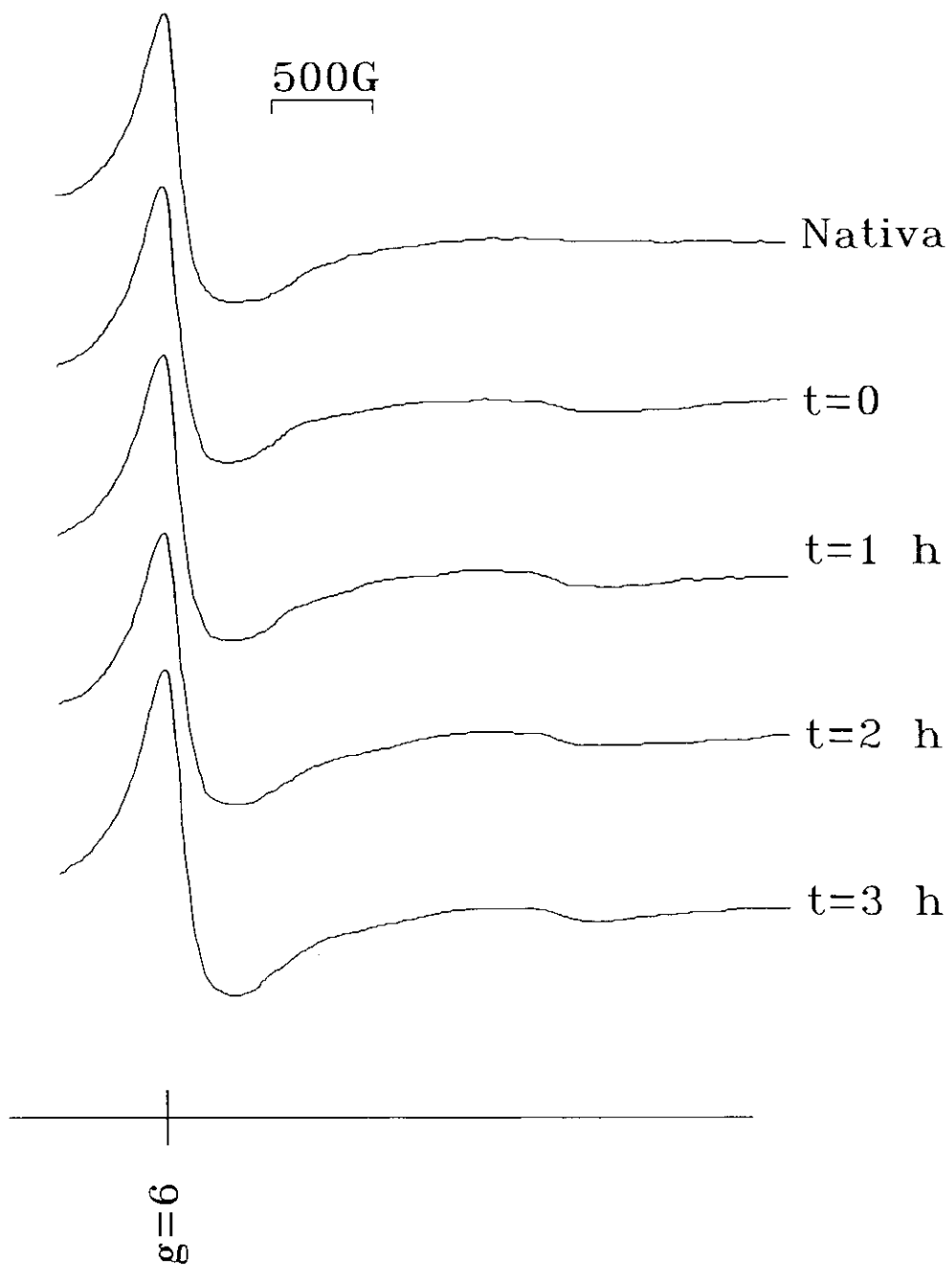


Figura 5.15: Espectros de RPE hematina tratada termicamente a 80°C com tempos de tratamentos diferentes. Ganho: 20

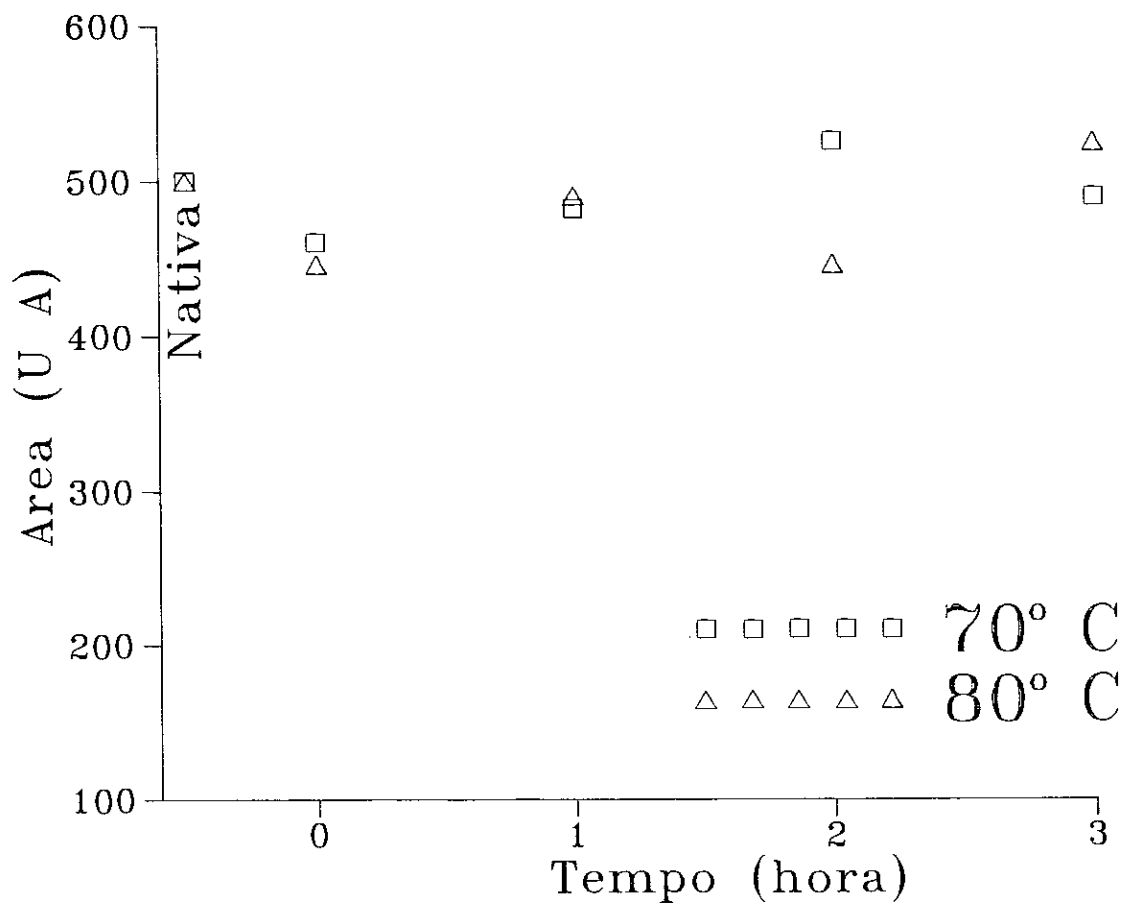


Figura 5.16: Variação da área do sinal de RPE de hematina tratada termicamente

## 5.4 Nitrosilhemoglobina

Nas figuras 5.17, 5.18 e 5.19 são mostrados os espectros de soluções de Hb saturadas com NO (NOHb na forma R) desnaturadas a 60°C, 70°C e 80°C respectivamente com o campo magnético variando de 2300G a 2700G, que é a região característica do sinal de NOHb. Espectros para mesmas amostras com campo magnético variando de 500G a aproximadamente 2300G, região característica de metaHb de spin alto e baixo, são mostrados nas figuras 5.20, 5.21 e 5.22. Estes espectros estão interrompidos onde começa o sinal de NOHb, muito mais intenso que o de metaHb.

A forma dos espectros apresenta o mesmo comportamento nas três temperaturas. O espectro da forma R de NOHb nativa é caracterizado pelo sinal alargado com extremos em  $g = 2,038$  e  $g = 1,986$  com simetria rômbrica em torno do centro paramagnético [3]. Com o tratamento térmico a intensidade deste sinal diminui enquanto o sinal com  $g = 2,07$  aumenta e aparece um triplete hiperfino com centro em  $g = 2,011$  com o aumento do tempo de desnaturação. O triplete é resultante da interação hiperfina com o nitrogênio do radical NO como se observa na forma T de NOHb [37].

Os espectros na região característica de metaHb mostram que uma pequena quantidade ( $\simeq 5\%$ ) de amostra tem o ferro não ligado ao NO. A amostra nativa apresenta a linha com  $g=6$  e um sinal de spin baixo com  $g=2,9$  e  $g=2,45$ . Este sinal apresenta as mesmas mudanças discutidas anteriormente com exceção do aparecimento e aumento da intensidade da linha de  $g=4,3$  durante o tratamento térmico.

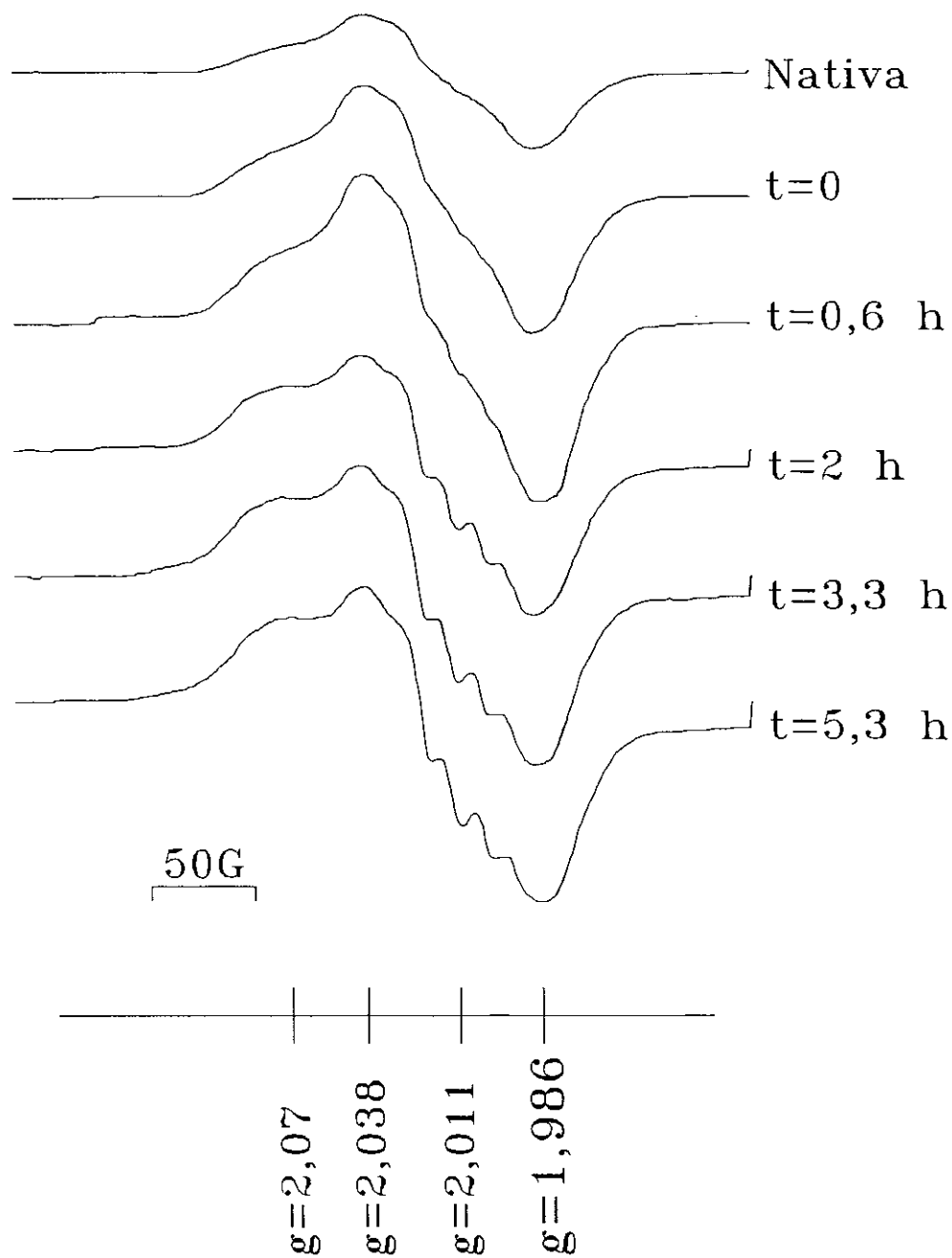


Figura 5.17: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 60°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63.

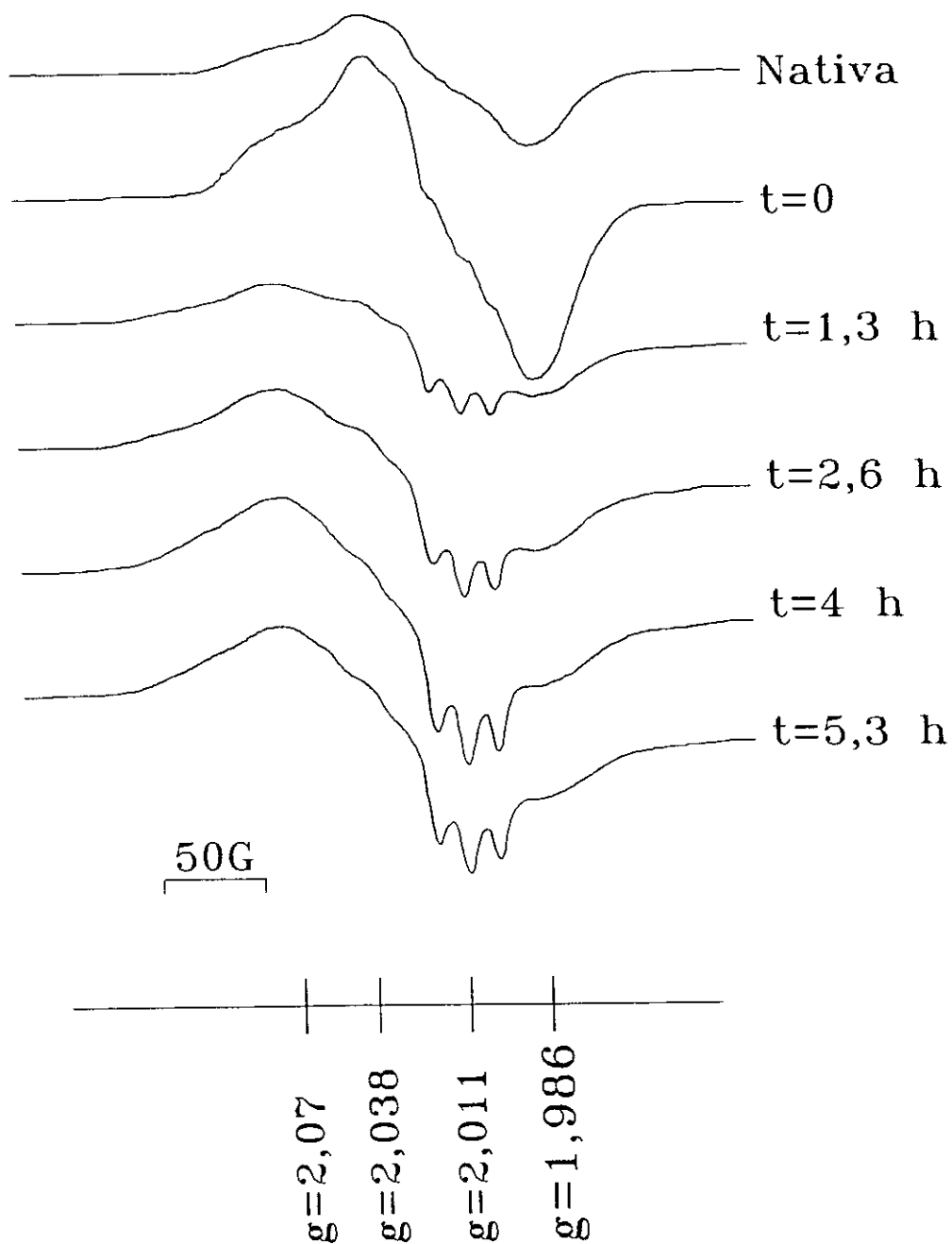


Figura 5.18: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 70°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63



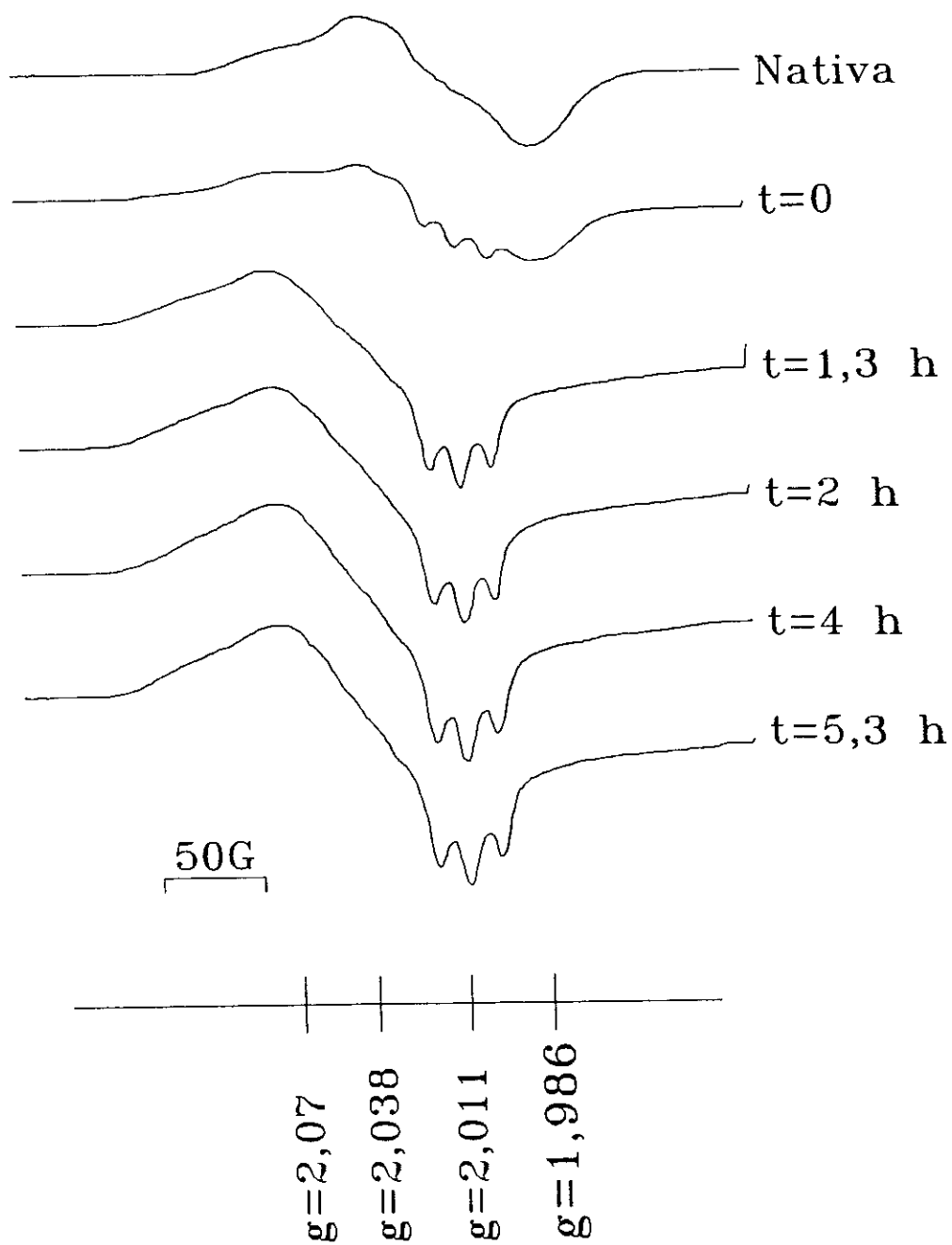


Figura 5.19: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes. Ganho: 63

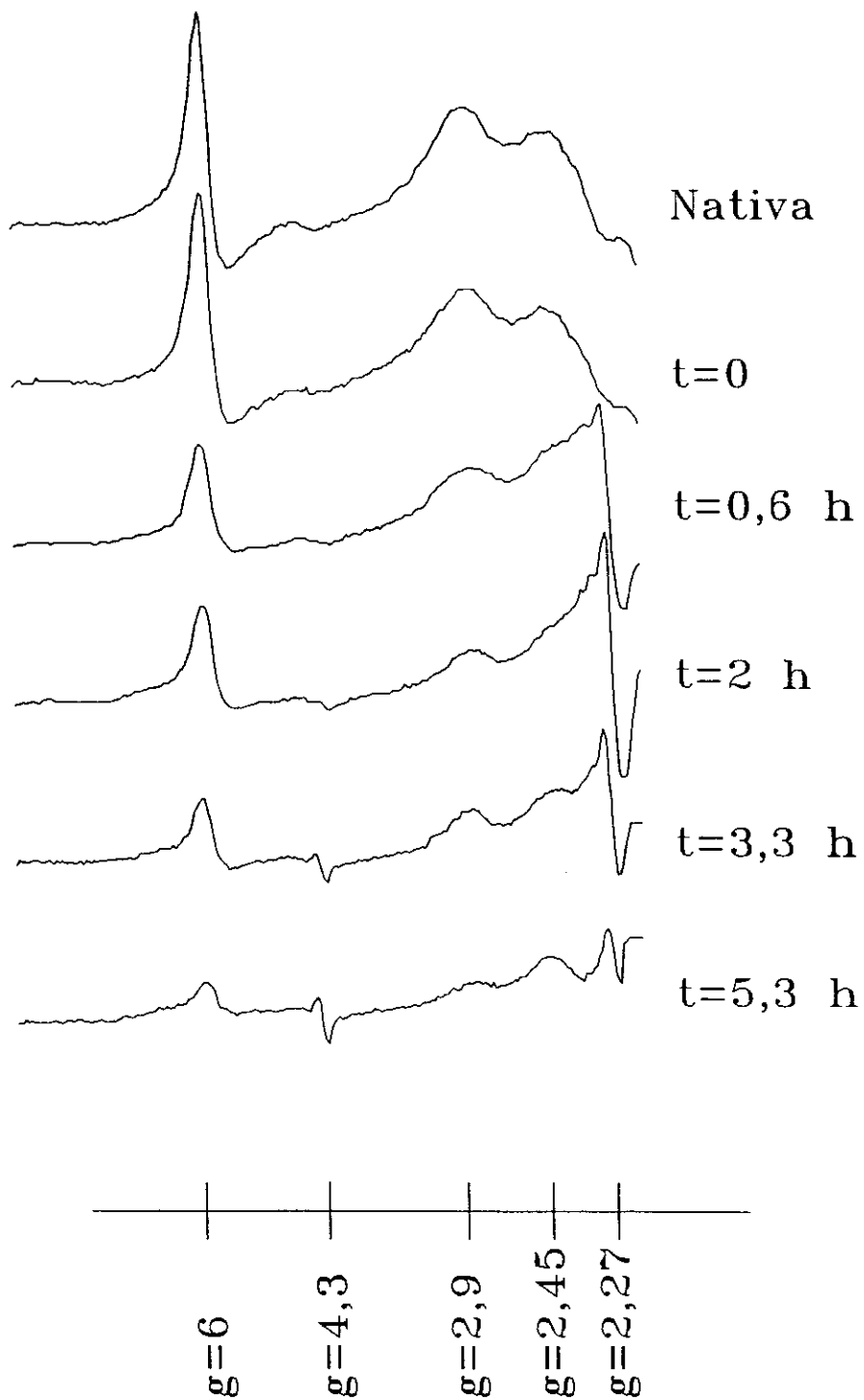


Figura 5.20: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 60°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a  $\approx$  2300 G.

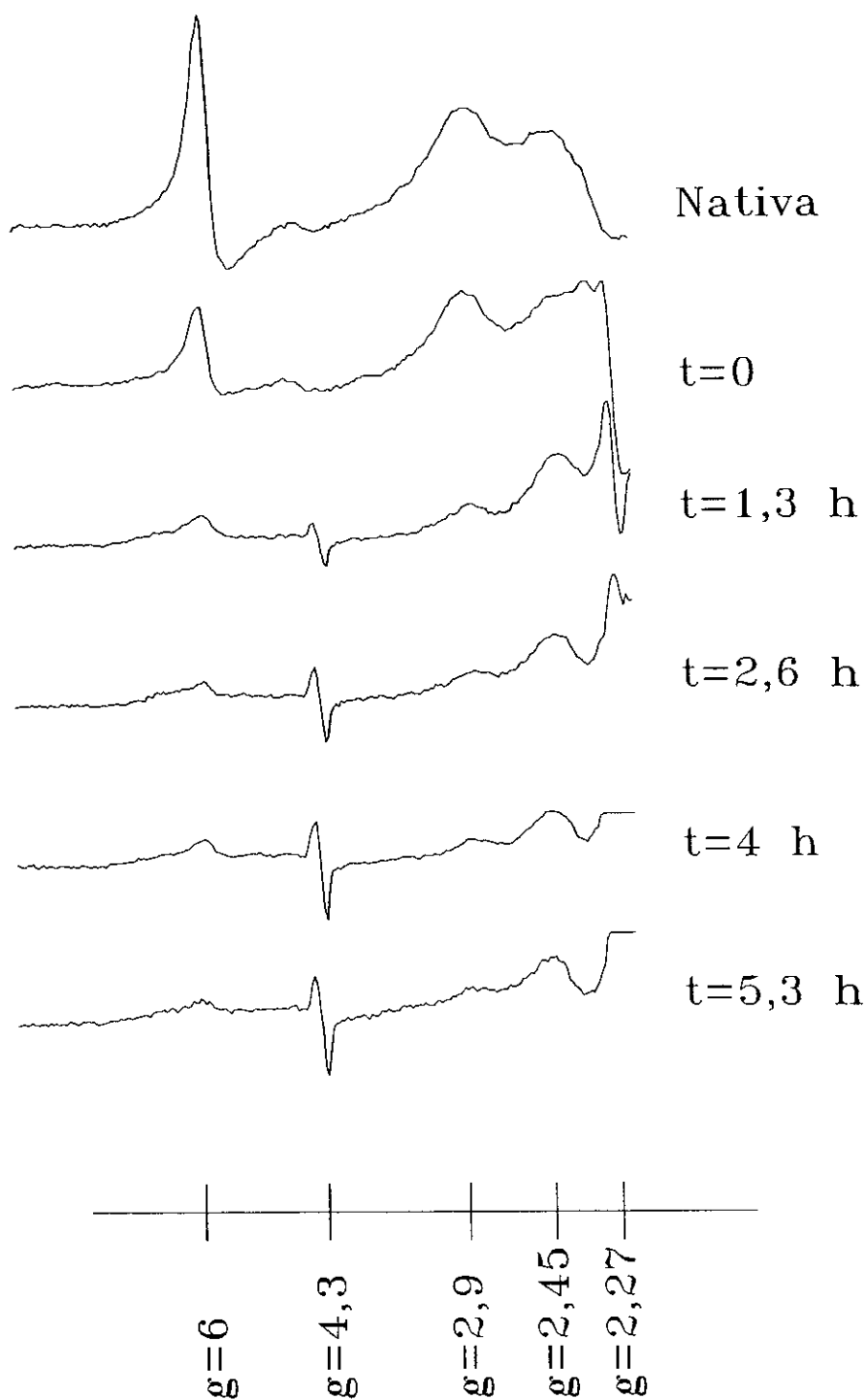


Figura 5.21: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 70°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a  $\approx$  2300 G.

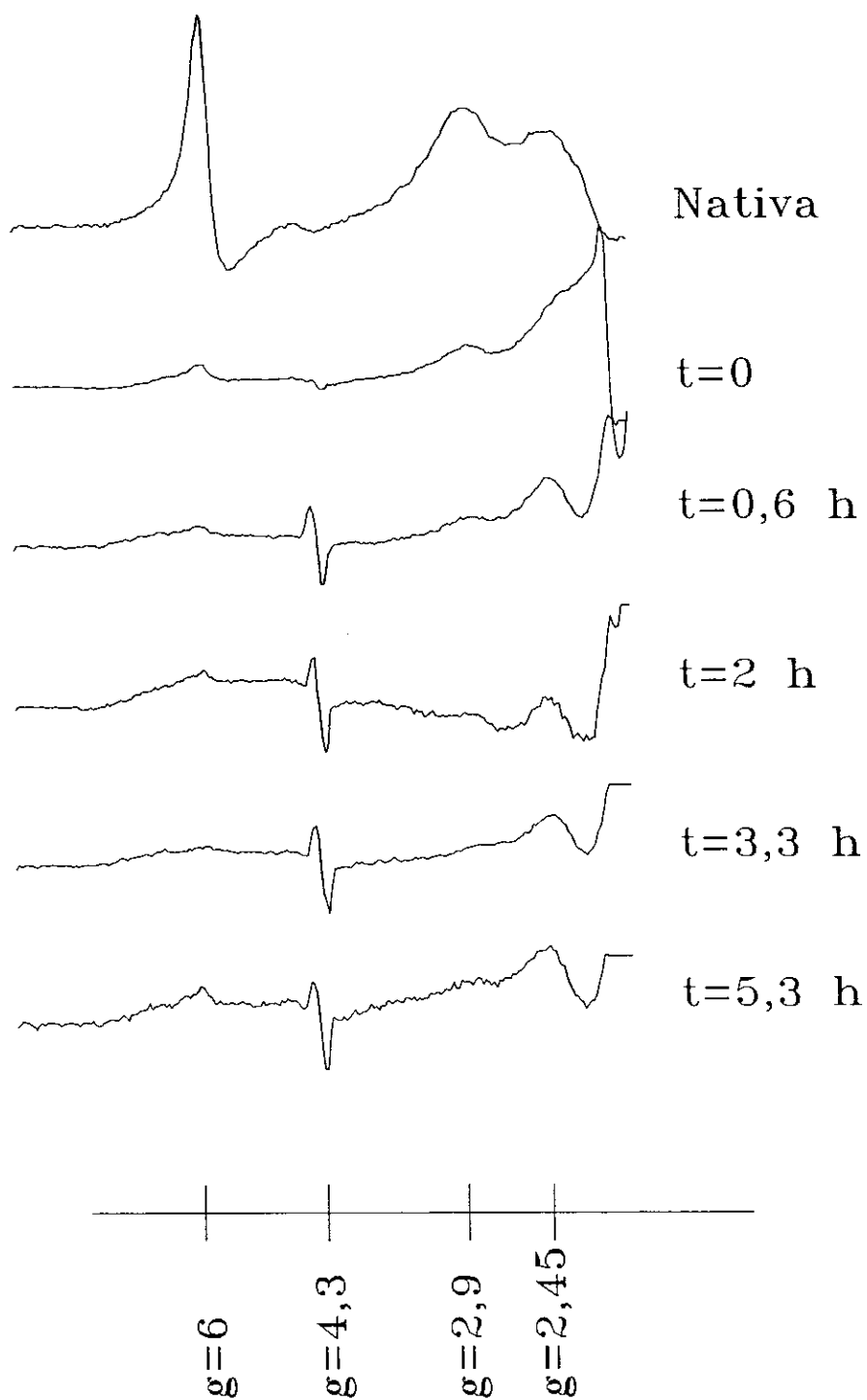


Figura 5.22: Espectros de RPE de NOHb desnaturada termicamente a 80°C. Ganho: 2500. Campo: 500 G a  $\approx$  2300 G.

A variação da área do sinal de NOHb em função do tempo de tratamento térmico é mostrada na figura 5.24. A diminuição acentuada da área, coincide com o aparecimento do tripleto hiperfino, que poderia introduzir um erro sistemático no cálculo da área. A estimativa deste erro, feita como descrita no capítulo 4, mesmo com a estrutura do tripleto tem um valor muito pequeno ( $\simeq 1\%$ ) que não é mostrado na figura. Portanto o comportamento observado nos gráficos da área do sinal não é devido a um erro no cálculo da área, apontando uma transição no processo.

A área apresenta um máximo quando as intensidades dos sinais com  $g = 2,038$  e  $g = 1,986$  são máximas e um mínimo quando o tripleto hiperfino aparece.

A variação da forma e da área do sinal indica que a desnaturação térmica de NOHb apresenta duas fases. A primeira fase é caracterizada por um aumento da área do sinal e ausência do tripleto hiperfino, e a segunda fase apresenta o tripleto hiperfino e também um crescimento da área. Entretanto as variações observadas durante a primeira fase (aumento da intensidade sem variação na forma do sinal) são características do aumento no número de moléculas de Fe com NO ligado, provavelmente devido a transformação da metaHb residual em NOHb, favorecida pelo aumento da temperatura. Esta hipótese é reforçada pela diminuição do sinal de metaHb.

Definimos o tempo de transição  $t_x^{NO}$  de uma fase para outra como o tempo necessário para o aparecimento do tripleto ou como o tempo em que aparece uma discontinuidade no gráfico da área.

O valor de  $t_x^{NO}$  para  $T = 60^\circ\text{C}$  é aproximadamente 2,3 h, para  $T = 70^\circ\text{C}$  é zero e as amostras tratadas em  $T = 80^\circ\text{C}$  já estão na segunda fase quando entram em equilíbrio

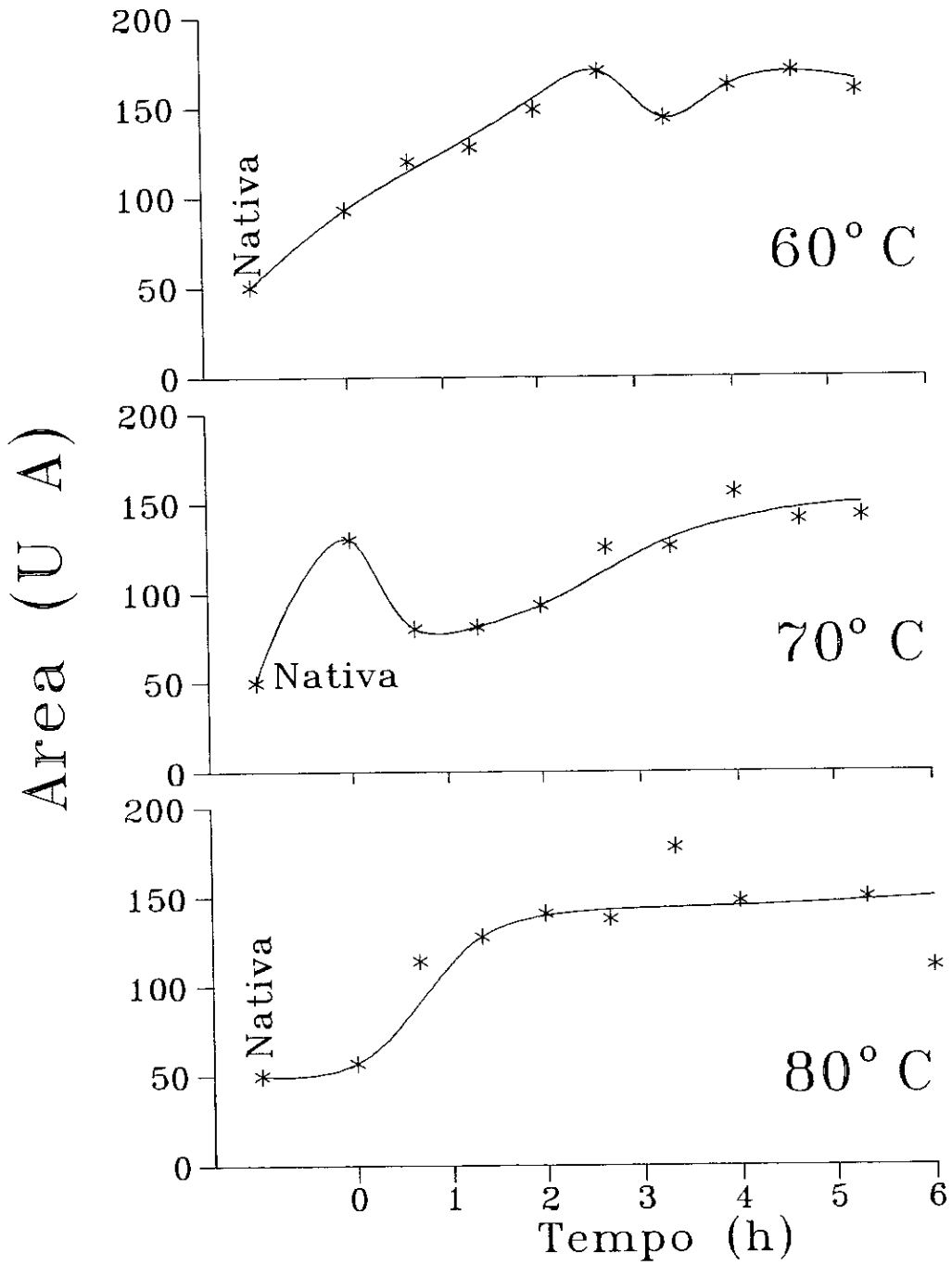
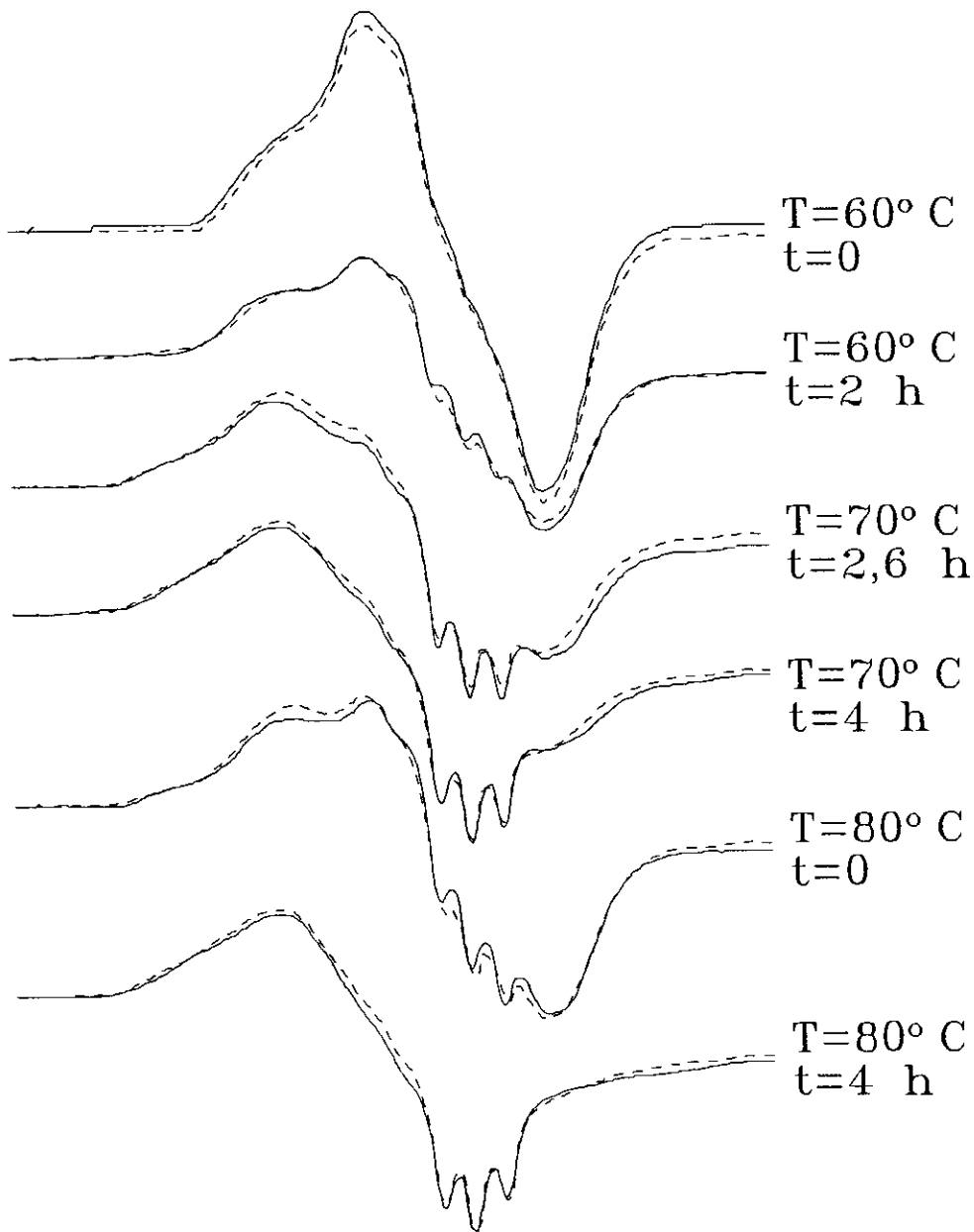


Figura 5.23: Área do sinal de NOHb

térmico com o banho.

Os espectros podem ser contruídos como combinação dos espectros característicos de cada fase. O da primeira fase ( $A^{NO}$ ) é o espectro da amostra nativa e o da segunda ( $B^{NO}$ ) é o estado final da amostra desnaturada a  $T = 80^{\circ}\text{C}$  (tempo máximo de tratamento: 6 horas).

O resultado da combinação das duas espécies características de cada fase são comparados com os espectros experimentais na figura 5.25, onde observa-se a boa reprodução de todos os espectros das amostras tratadas termicamente.



— Experimental  
 - - - Teórica

Figura 5.24: Comparação dos espectros obtidos como combinação dos espectros inicial ( $A^{NO}$ ) e final ( $B^{NO}$ ) da desnaturação com experimentais. Áreas normalizadas.



A variação da proporção de cada espécie durante a desnaturação é mostrada na figura 5.26. O comportamento das espécies são opostos. A espécie  $A^{NO}$  diminui até um valor final de equilíbrio que é menor para temperaturas maiores e igual a zero para amostras desnaturadas a  $T = 80^{\circ}\text{C}$ , enquanto que  $B^{NO}$  cresce até um valor final que tende a 1 com o aumento da temperatura. Existe uma conversão da forma  $A^{NO}$  em  $B^{NO}$ .

O tempo de transição  $t_x^{NO}$  pode ser definido em função do comportamento das espécies como o tempo necessário para que as curvas das frações em função do tempo se cruzem, invertam sua posição no gráfico, ou seja, em  $t = t_x^{NO}$  as proporções de cada espécie são iguais a 0,5. Para tempos menores que  $t_x^{NO}$  a proporção de  $A^{NO}$  é maior que a de  $B^{NO}$ , enquanto que para tempos maiores que  $t_x^{NO}$  a relação se inverte.

O tempo de transição definido dessa forma é aproximadamente igual ao tempo de transição encontrado pela análise do comportamento da área do sinal para  $T = 70^{\circ}\text{C}$  e  $T = 80^{\circ}\text{C}$ . Para  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , apesar das curvas das proporções de cada espécie não se cruzarem, elas tendem a valores limites em um tempo aproximadamente igual a  $t_x^{NO}$ . Estes valores limites se aproximam do valor 0,5 definido para  $T = 70^{\circ}\text{C}$  e  $T = 80^{\circ}\text{C}$ .

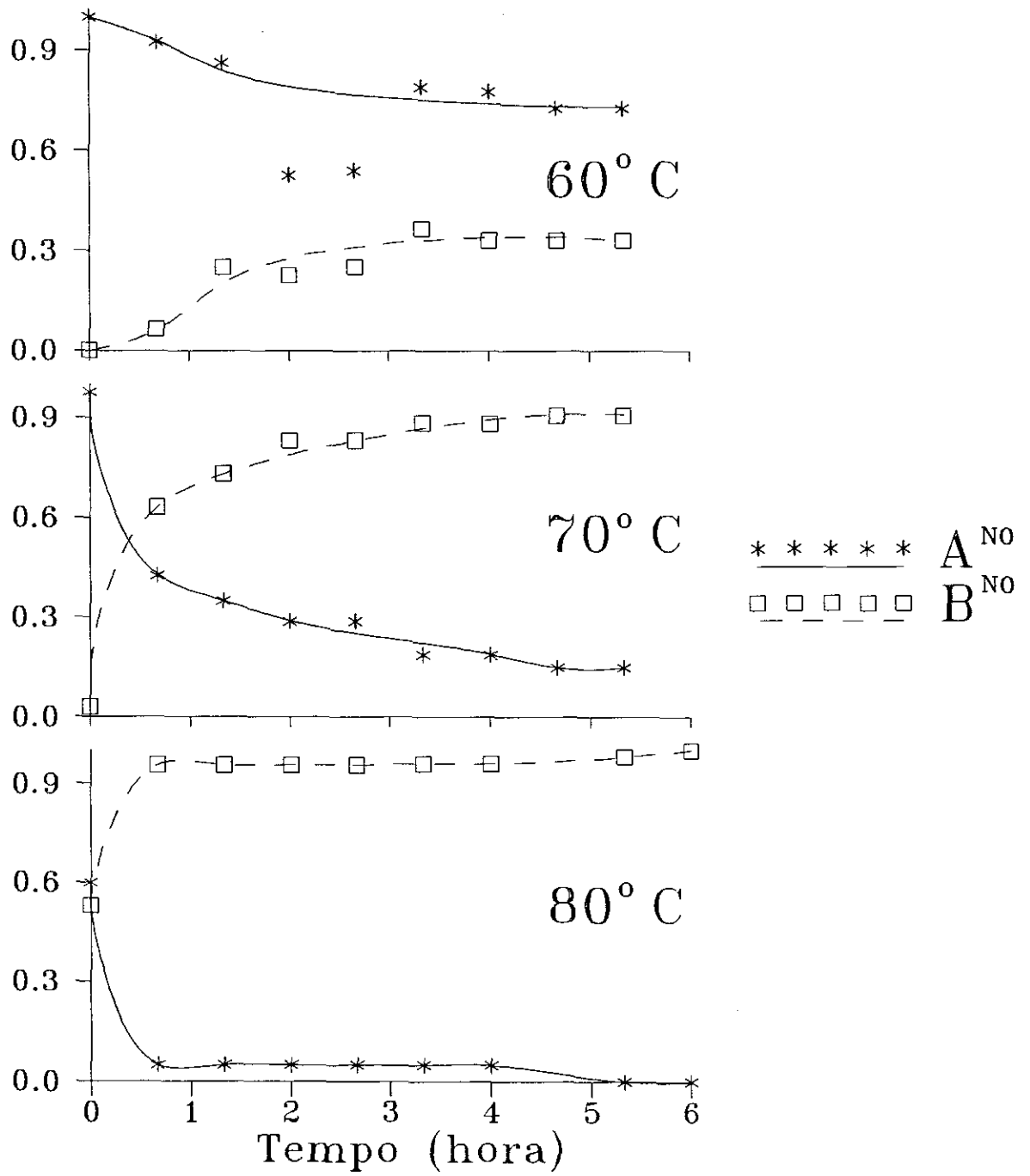


Figura 5.25: Proporções de cada especie de NOHb

# Capítulo 6

## Conclusões

### 6.1 Metahemoglobina

O processo de desnaturação térmica a temperaturas fixas e diferentes tempos de tratamento de metaHb acontece em duas fases que são caracterizadas por sinais de RPE diferentes e o tempo de conclusão de cada fase diminui com o aumento da temperatura.

Como discutido no capítulo 3, estudos anteriores de desnaturação térmica variando a temperatura e com mesmo tempo de tratamento de oxiHb e metaHb [1] mostraram que a desnaturação acontece em etapas e existe uma temperatura de transição  $T_x$  de uma etapa para outra. O fato de os sinais de RPE se modificarem em grupos levou a hipótese que os sinais característicos de cada etapa estavam associados a diferentes espécies que não foram identificadas.

Posteriormente, as mudanças observadas nos espectros de absorção ótica e RPE, durante o tratamento com salicato e uréia (ou espontaneamente com um tempo maior), foram caracterizadas como sendo devidas à ligação de átomos da globina (identificados) ao átomo de ferro [2,15].

A comparação entre os resultados descritos acima e o obtido neste trabalho sugere que as mudanças observadas no sinal de RPE estão associadas as mudanças dos ligantes do ferro. O estado inicial com um sinal de RPE com  $g = 6$ , característico do íon ferro férrico  $Fe^{3+}$  estado de spin alto ( $S = 5/2$ ), que tem como sexto ligante uma molécula de água é transformado durante a primeira etapa em espécies também com o íon ferro férrico, porém com estado de spin baixo ( $S = 1/2$ ), que são devidos à ligação de átomos da globina ao átomo de ferro (ligantes endógenos).

As alterações no sinal de spin baixo que acontecem durante a segunda etapa são devidas à substituição de um ligante endógeno por outro, isto é, a transformação de uma espécie de spin baixo em outra. A tentativa de isolar os espectros das espécies que aparecem, bloqueando com NEM as cisteínas acessíveis no estado nativo, que seriam prováveis ligantes endógenos, resultou na caracterização de outras espécies como descrito no capítulo 5. Desta forma para descrever o processo por RPE são necessárias três espécies.

A primeira espécie com um sinal com  $g = 2,9 \pm 0,1$  e 2,27, chamada C, pode ser identificada como o hemicromo H que tem um terceiro valor de  $g$  (1,65) que não está resolvido. O quinto e sexto ligantes deste hemicromo são duas histidinas. A segunda espécie, B, é o hemicromo P com  $g=2,45, 2,27$  e 1,91 que têm como 5º ligante uma base nitrogenada e como 6º uma cisteína. O aparecimento deste hemicromo mesmo quando a cisteína  $\beta 93$  está bloqueada e o seu desaparecimento no final do tratamento térmico, mostra que durante a desnaturação a estrutura da globina é alterada o suficiente para que outras cisteínas ( $\alpha 104$  ou  $\beta 117$ ) se liguem ao ferro. Na figura 1.3, fica evidente pela

posição nas cadeias, que é mais provável que a outra cisteína que se liga ao ferro é a da posição  $\alpha 104$ .

A identificação de B e C com os hemicromos H e P é razoável, uma vez que durante o processo de desnaturação térmica uma certa quantidade de água é retirada e as moléculas de Hb com grau de hidratação baixo (menores que 0,45 gr de  $H_2O$ /gr de Hb) apresentam os hemicromos H e P [29]. Este argumento é reforçado quando verifica-se que o espectro de metaHb desidratada pode ser reconstituído pela combinação dos espectros B e C, como é mostrado na figura 6.1.

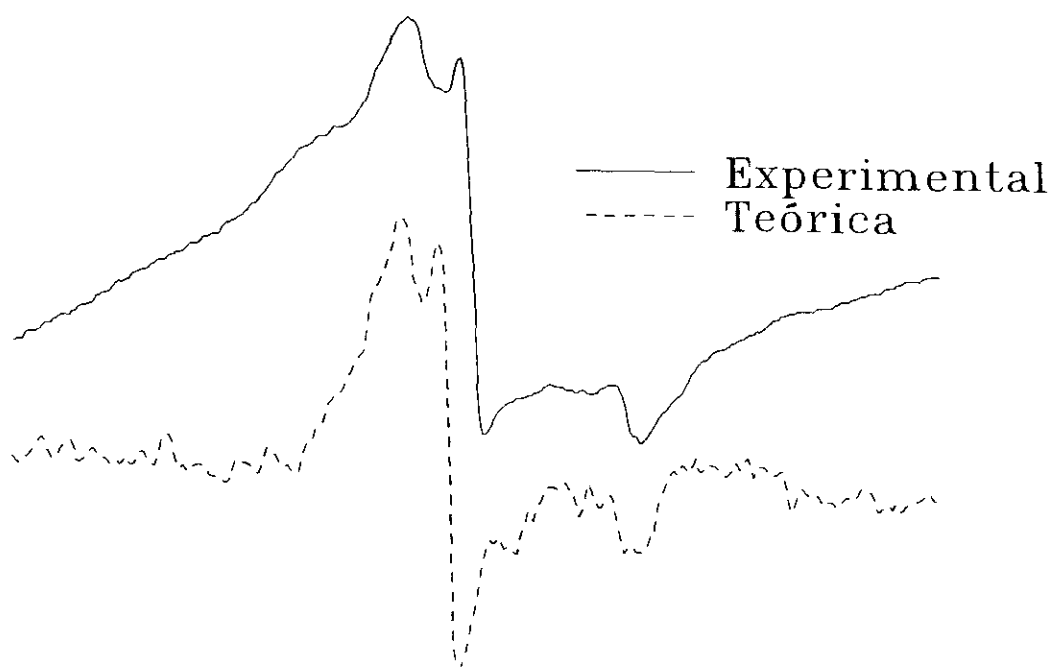


Figura 6.1: comparação entre o espectro experimental de metaHb desidratada e o obtido como combinação das espécies B e C.

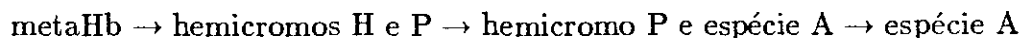
Como resultado desta análise espectral ficam determinados os espectros isolados dos

hemicromos H e P em metaHb.

Na primeira etapa da desnaturação térmica o sinal com spin alto se transforma nos sinais dos hemicromos H e P, sendo a quantidade que se transforma no hemicromo H menor do que a que se transforma em P.

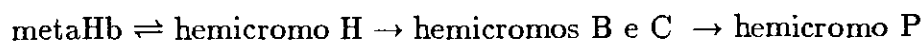
Na segunda etapa os hemicromos H e P se transformam em uma terceira espécie (A), cujos valores de  $g$  ( $2,9 \pm 0,1$ ,  $2,27$  e  $1,85$ ) não foram encontrados na literatura como característicos de nenhum derivado de metaHb de spin baixo. No entanto este conjunto de valores é coerente com os resultados de spin baixo discutidos no capítulo 2. Usando a relação 2.16, e tomando  $g_y = 2,27$  e  $g_z = 1,85$  (uma vez que as linhas de campos mais altos são obtidas com maior precisão) obtém-se  $g_x = 3,00$  que é da ordem do valor experimental.

A sequência das reações é:



O hemicromo P pode ser formado devido a ligação de cisteínas nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que a ligação na fração que pode estar associada às cadeias  $\alpha$  é rompida primeiro do que a associada às cadeias  $\beta$ .

O estudo do processo de desnaturação por outros agentes utilizando RPE e ótica mostrou que a formação dos hemicromos é um passo intermediário, que leva a um estado final caracterizado pelo hemicromo P [13]. Como descrito no capítulo 1 a sequência das reações é:



Neste trabalho não se observa a formação dos hemicromos B e C e o aparecimento dos hemicromos H e P é simultâneo, o que indica que na desnaturação térmica nas três temperaturas estudadas, a segunda reação pode ser rápida em comparação com o menor intervalo de medida, 0,5 h. Entretanto, uma pequena porção dos hemicromos B e C pode ter sido formada e não observada devido a superposição dos seus sinais, com  $g = 2,95, 2,26$  e  $1,43$  e  $g = 3,06, 2,24$  e  $1,45$  respectivamente, com os sinais das outras espécies. As linhas distinguíveis ( $g=1,43$  e  $1,45$ ) são de difícil detecção.

Além disso o tratamento do sinal de RPE, permitiu distinguir uma outra etapa do processo num estado mais desnaturado que o hemicromo P, que é caracterizado pelo espectro da espécie A. A estrutura associada a esta componente não pôde ser identificada.

O processo é qualitativamente equivalente nas três temperaturas. Consideramos que o processo em cada temperatura termina quando as proporções de cada espécie e a forma dos espectros não variam. Os estados finais são diferentes nas três temperaturas, sendo os estados finais do processo a temperaturas menores iguais aos estados intermediários do mesmo processo a temperaturas maiores. Portanto, é provável que o processo em qualquer temperatura leve ao mesmo estado paramagnético final caracterizado pela espécie A, com os tempos de tratamento maiores para temperaturas menores.

No entanto a espécie A pode não ser o estado final da proteína no processo de desnaturação, pois a variação da área total mostra que o sinal de RPE diminui com o aumento do grau de desnaturação, isto é, com o aumento do tempo ou da temperatura de tratamento. Esta tendência do sinal de diminuir dificulta a observação da espécie A em

temperaturas maiores, e indica uma transformação para uma forma não paramagnética ou para uma estrutura que favorece a interação entre átomos de ferro causando um alargamento do sinal.

O processo de desnaturação depende da presença de água. Em amostras desidratadas as mudanças que ocorrem na forma e na área dos sinais de RPE são muito pequenas e devidas principalmente a evaporação de água.

O hemicromo P formado durante a desidratação ocorre somente devido a ligação das cisteínas 93 nas cadeias  $\beta$  [29], enquanto que na desnaturação térmica existe a possibilidade de ocorrer com outras cisteínas provavelmente nas cadeias  $\alpha$ . Esta ligação com outras cisteínas não foi descrita anteriormente.

Em amostras com hidratações mais baixas é esperado que as cadeias da molécula de Hb tenham menor mobilidade. As poucas variações observadas durante o tratamento térmico de amostras desidratadas pode ser devida a essa menor mobilidade, que não permite uma distorção maior, favorecendo a formação de outros hemicromos irreversíveis, como observado em solução de metaHb.

As mudanças que ocorrem no sinal de RPE do ferro da heme durante a desnaturação térmica de solução de Hb é devido principalmente a presença da globina, como é visto pelo resultado do tratamento térmico de hematina, onde não é observada nenhuma variação na forma ou na área do sinal, devido a alteração do íon Fe.

A observação do sinal de RPE de hematina oxidada com  $K_3[Fe(CN)_6]$  (estado férrico  $Fe^{3+}$ ), mostra que a não observação do sinal de RPE de metaHb em pH 2,1 não está associada somente a expulsão parcial da heme da globina [49]. Para o desaparecimento



do sinal deve haver alguma outra alteração na heme, tal como formação de um complexo não paramagnético ou aparecimento de uma interação Fe-Fe devido a uma aproximação de duas hemes.

## 6.2 Nitrosilhemoglobina

A desnaturação de NOHb acontece em uma etapa, caracterizada pela mudança na forma do sinal de RPE e com tempo de conclusão que depende da temperatura.

O espectro inicial característico é da amostra nativa na forma R de NOHb com um sinal de RPE alargado com extremos em  $g = 2,038$  e  $g = 1,986$  e simetria rômbrica em torno do centro paramagnético. E o que caracteriza o estado final da transformação da molécula é o obtido com maior tempo de desnaturação a  $80^{\circ}\text{C}$ , associado ao sinal com  $g = 2,07$  e um triplete hiperfino com centro em  $g = 2,011$ . Este triplete é semelhante àquele dado como característico do estado desnaturado de NOHb produzido por detergentes [3].

Devido aos resultados dos modelos experimentais e teóricos vistos no capítulo 2, para explicar o desdobramento hiperfino que aparece na transição R-T, este triplete deve estar associado à quebra de ligação entre o imidazol da histidina proximal e o ferro.

A modificação que ocorre na transição R-T é considerada ocorrer somente nas cadeias  $\alpha$ . Já que a mudança do espectro de RPE observada na desnaturação é semelhante àquela da transição R-T e como nenhum espectro de cadeias  $\beta$  apresenta o triplete, é provável que também na desnaturação esta característica esteja associada

somente à cadeia  $\alpha$ .

O tempo de transição  $t_x^{NO}$ , é o tempo necessário para as amostras passarem de um estado com características de estado nativo para um com características de estado desnaturado. Este tempo pode ser definido a partir da análise dos gráficos da área do sinal ou das proporções da amostra nativa ( $A^{NO}$ ) ou do estado mais desnaturado ( $B^{NO}$ ) nos espectros da série do tratamento térmico.

O tempo de transição  $t_x^{NO}$  para NOHb é menor do que  $t_x$  para metaHb para o tratamento a  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $T = 70^\circ\text{C}$  e a  $T = 80^\circ\text{C}$  é difícil definir, uma vez que as amostras de metaHb já estão na segunda etapa da desnaturação quando entram em equilíbrio com o banho. O significado desta diferença é difícil de ser interpretado. Os tempos de transição podem estar relacionados a mudanças estruturais que não são necessariamente idênticas para metaHb e NOHb e os espectros dos dois complexos são sensíveis a diferentes alterações na vizinhança do ferro.

Por outro lado é interessante ressaltar que os espectros de NOHb e metaHb podem estar refletindo a mesma alteração estrutural da molécula: o rompimento da ligação entre a histidina e o ferro. Na metaHb a transformação do hemicromo H com o ferro ligado a duas histidinas em outro complexo e na NOHb pelo aparecimento do tripleto, entretanto para esta a mudança ocorre provavelmente somente nas cadeias  $\alpha$ , enquanto para metaHb esta restrição não é aparente.

Novamente parece que os estados finais em temperaturas de desnaturação mais baixa são estados intermediários dos estados finais em temperaturas mais altas e que o processo é qualitativamente equivalente em qualquer temperatura. Um argumento que

reforça esta hipótese é o fato de que os espectros das amostras para qualquer tempo e temperatura de tratamento são descritos como combinação dos espectros da amostra nativa e do estado final a  $T = 80^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3 Sugestões para continuidade dos estudos

Neste trabalho estudamos o processo de desnaturação térmica, obtendo suas características e comparando com as observadas usando outros agentes desnaturantes tanto para metaHb como para NOHb. Entretanto para uma maior compreensão do processo existem alguns outros aspectos que são importantes a serem estudados, tais como: a ausência ou não de reações intermediárias e a origem da espécie A para metaHb, a influência da globina na estabilidade da molécula e as alterações que acontecem em cada cadeia isolada. Com esse objetivo apresentamos algumas sugestões para continuidade dos estudos:

- Estudo da desnaturação térmica de metaHb a tempos e temperaturas menores, para verificar a existência da segunda reação que é observada por outros métodos de desnaturação e confirmação das espécies identificadas.
- Identificar a espécie A usando outras técnicas experimentais ou modelos de heme reproduzindo outros possíveis ligantes endógenos.
- Estudo da desnaturação térmica das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas no estado  $\text{Fe}^{3+}$  para verificar se a espécie A se forma somente em uma cadeia ou em ambas, os efeitos da globina nas cadeias isoladas e comparar a estabilidade das cadeias.

- Estudo da desnaturação térmica das cadeias  $\alpha$ NO e  $\beta$ NO isoladas para verificar se as alterações na molécula toda são devidas somente as cadeias  $\alpha$  e quais são as alterações nas cadeias  $\beta$ .
- O estudo da desnaturação térmica de mioglobina pode contribuir para a verificação das espécies devido a pequenas diferenças na sequência de aminoácidos (ausência de cisteínas) e da influência da estrutura quaternária na estabilidade da proteína.

# Apêndice A

Programa usado para o cálculo da área do sinal e fazer a correção na linha de base.

```
dimension a(2000), ai(2000), ra(2000), sai(2000), r(2000)
write(*,*) 'numero de pontos : '
read(*,*)n
write(*,*) 'canal : '
read(*,*)c
r=c/r
read(6,*)a(i)
10 continue
ba = (a(n+1)-a(2))/n
do 9 k = 1,n
a2(k)=a(k+1)
9 continue
do 11 i = 1,r
a1(i) = a(i) - ba*r
a1(i)=a1(i)/r
11 continue
a2(n+1)=a2(n)
sai(1) = 0
do 12 i = 1,n
sai(i) = ((a2(i+1)-a2(i))/E)*r + sai(i-1)
12 cont = 1
do 13 i=1,n
sai(i)=r
sai(k) = ((a2(i+1)-a2(i))/E)*r + sai(i-1)
write(7,*) sai(k)
13 continue
stop
```

# Bibliografia

- [1] Hollocher, T.C. (1965) *J. Mol. Chem.* **241(9)**, 1958–1968.
- [2] Rachmilewitz, E.A., Peisach, J. and Blumberg, W.E. (1971) *J. Biol. Chem.* **246(10)**, 3356–66.
- [3] Kon, H. (1968) *J. Bio. Chem.* **73**, 469–482.
- [4] Dickerson, R.E. and Geis, I. (1983). *Hemoglobin*. The Benjamin Cumming Publishing Company, California.
- [5] Perutz, M.D., (1964) *Sci. Ame.* **211(5)**, 64–76.
- [6] Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.
- [7] Austin, R.H, Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. (1975) *Biochemistry* **14(24)**, 5355–73.
- [8] Agmon, N. and Hopfield, J.J (1983) *J. Chem. Phys.* **79(4)**, 2042–53.
- [9] Young, P.D. and Bowne, S.F. (1984) *J. Chem. Phys.* **81(8)**, 3730–37.
- [10] El-Jaick, L., Wajnberg, E., Bemski, G. and Linhares, M.P. (1988) *Int. J. Biol. Macromol.* **10**, 185–190.

- [11] Wajnberg,E., Kalinowski,H.J. and Bemski,G. (1985) *An. Acad. Brasil. Ciên.* **57**, 13-17.
- [12] Heinz,R. (1890) *Virchows Arch. Path. Anat. Physiol.* **122**,100-124.
- [13] Peisach,J. and Blumberg,W.E. (1971) *Proc. of the First Interamericam Symposium on Hemoglobin,Caracas.*
- [14] Rachmilewitz,E.A. (1969) *An. N. Y. Acad. Sci.* **48**,2049-52.
- [15] Peisach,J., Blumberg,W.E. and Adler, A. (1973) *An. N. Y. Acad. Sci.* **206**,310-327.
- [16] Salmeen,I. and Palmer,G. (1968) *J. Chem. Phys.* **48**,2049-52.
- [17] Peisach,J. and Blumberg,W.E. (1970) *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* **67**,172-179.
- [18] Kosman, D.J. (1984) *Strutural and Resonance Techniques in Biological Reserch* (Rousseau,P.L. ed.) Murray Hill, New Jersey, 89-244.
- [19] Griffith,J.S. (1961) *The theory of transitions-metal ions* Cambridge Univ.Press, London.
- [20] Poole jr.,(1983) *Electron spin resonance* John Wiley,New York.
- [21] Scheidt and Gouterman (1983) In *Iron porphyrins - part one* (Lever,A.B.P.and Gray, H.B., eds) Addison-wesley,Massachusetts.
- [22] Peisach,J., Blumberg,W.E., Ogawa,S., Rachmilewitz,E.A. and Oltizik (1971) *J.Biol.Chem.* **246(10)**,3342-3355.

- [23] Taylor,C.P.S. (1977) *Bio. Bio. Acta* **491**, 137–149.
- [24] Perutz,M.A., Kilmartin,J.V., Nagai,K., Szabo,A. and Symon,S.R.  
(1976) *Biochemistry* **15**,378–387.
- [25] Henry,Y. and Banerjee, R. (1973) *J.Mol.Bio.* **73**,469–482.
- [26] Chevion, M.,Salhany, J. M.,Peisach, J.,Blumberg, W.E. and Simon, S.,(1978) *Bio-chemistry* **17**,1745–1750.
- [27] Szabo,A. and Perutz,M.F. (1976) *Biochemistry* **15**,4427–4428.
- [28] Reisberg,P., Olson,J.S. and Palmer, G.(1976) *J. Biol. Chem.* **251(14)**,4379–4383.
- [29] Neto,L.M. (1988) Tese de Doutorado, IFQSC-USP, São Carlos, SP.
- [30] Chevion, M.,Stern, A., Peisach, J.,Castillo, C.L. and Blumberg W.E.,(1976) *Israel J.Chem* **15**,311–317.
- [31] Neto,L.M., Nascimento,O.R., Tabak,M. and Caracelli,I. (1988) *Bio.Bio Acta* **956**,189–196.
- [32] Scholler,D.M.,Wang,M.R. and Haffman,B.M. (1979) *J.Bio. Chem.* **254**,4072–4078.
- [33] Wajnberg,E., Linhares,M.P., El-Jaick,L.J. and Bemski,G.(1990) *Notas de Física-CBPF-NF-036/90*.
- [34] Peisach,J. (1975) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **244**,187–203.
- [35] Dickinson,L.C. and Chien,J.C.W. (1977) *J.Am.Chem.Soc.* **93**,5036–5040.



- [36] Kon,H.(1975) *Bio. Bio. Acta* **379**,103–113.
- [37] Maxwell,J.C. and Caughey,W.S. (1976) *Biochemistry* **15**,388–396.
- [38] Trittelvitz,E., Gersonde,K. and Winterhalter,K.H. (1975) *Europ.J. Biochem.* **51**,33–42.
- [39] Doetschman,D.C.,Schartz,S.A. and Utterback,S.G. (1980) *Chem. Phys.* **49**,1–8.
- [40] Mun,S.K.,Chang, J.C. and Das, T.P. (1979) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **76** ,4842–4846.
- [41] Dickinson,L.C. and Symons,M.C.R. (1983) *Chem.Soc.Rev.* **12**,387–414.
- [42] Tanford,C. (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**,121–282.
- [43] Pfeil,W. and Privalov,P.L. (1976) *Biophys. Chem.* **4**,33–40.
- [44] Jaenicke,R. (1987) *Prog. Biophys. Molec. Bio.* **49**,117–237.
- [45] Hollocher,T.C. and Buckley,L.M. (1966) *J. Bio. Chem.* **241**(12),2976–2980.
- [46] Beychok,S., de Lozé,C. and Blout,E.R. (1962) *J. Mol. Biol.* **4**,421–429.
- [47] Polet,H. and Steinhardt,J. (1969) *Biochemistry* **8**(3),857–864.
- [48] Allis,J.W. and Steinhardt,J. (1969) *Biochemistry* **8**(12),5075–5081.
- [49] Steinhardt,J., Polet,H. and Moezie,F. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**,3988.
- [50] McGrath,W.P. and Steinhardt,J. (1971) *Biochemistry* **10**(9),1629–1632.

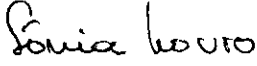
- [51] Kawahara,K., Kishner, A.G. and Tanford, C. (1965) *Biochemistry* 4(7),1203–1213.
- [52] Di Iorio,E.E. (1981) In *Methods in Enzymology; vol. 76- Hemoglobins* (Antonini,E., Rossi-Bernardi,L. and Chiancone,E. Eds.) 52–72.
- [53] Bennet,J.E., Ingram,D.J.E., George,P. and Griffith, J.S. (1955) *Nature* 176,394.
- [54] Kotami,M. and Morimoto,H. (1967) *Magnetic Resonance in Biological Systems* Ehremberg,A., Malmstrom,B.G. and Vanngard,T. eds. Pergamon Press.

# "DESNATURAÇÃO TÉRMICA DE HEMOGLOBINA POR RPE"


ODIVALDO CAMBRAIA ALVES

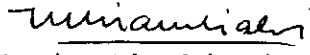
Tese de Mestrado apresentada ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, fazendo parte da banca examinadora os seguintes professores:

  
Eliane Wajnberg - Presidente

  
Sonia Renaux Wanderley Louro

  
Ladislau Martin Neto

  
George Bemski

  
Mario Giambiagi

Rio de Janeiro, 05 de abril de 1991.