

Marco Antonio Flores Rivera

Nitrosil Hemoproteínas:

Um estudo por EPR em banda Q

Tese de Mestrado

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro

Março de 1996

Dedicatória

A María e Francisco

Agradecimentos

Aos orientadores George Bemski e Eliane Wajnberg por todas as orientações, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho. Sobretudo pela confiança depositada em mim.

Aos professores Otaciro Rangel Nascimento e Cristina Figueiredo por ter nos cedido o programa que permitiu a simulação dos espectros de EPR. Também pelos ensinamentos no uso do programa.

A Odivaldo Cambraia Alves pelos ensinamentos na preparação das amostras e no uso do espectrômetro EPR Bruker, pela ajuda nas medidas a baixa temperatura e pelas discussões deste trabalho.

A Elena Mavropoulos e Andreia pela ajuda na preparação das amostras.

A Delson Schramm pelos ensinamentos nas medidas de EPR em banda Q.

A minha família e a todos os amigos, em especial: a Dalber Sánchez, Rodolfo Casana, Guillermo Cuba, Gino Janampa, Roger Metzger Germán Gomero e Ángel Bustamante, pelo apoio e estímulo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Resumo

Os espectros EPR em banda-Q de Nitrosil Hemoglobina (HbNO) e Nitrosil Mioglobina (MbNO) foram estudados em função da temperatura, na faixa entre 19 K e 200 K. Encontrou-se que os espectros de ambas proteínas nitrosiladas apresentam dois tipos de mudanças em função da temperatura. A primeira pode ser associada à existência de duas espécies paramagnéticas, uma com simetria rômica e outra com simetria axial. A segunda, é observada pelas variações nos valores dos fatores g e nas larguras de linhas; para a espécie rômica associada à variação de orientação do ligante Fe-NO e para a axial com a variação da distância entre Fe e N da histidina próxima (F8). Ambos tipos de mudanças espectrais foram reproduzidas computacionalmente.

As mudanças foram correlacionadas com subestados conformacionais, tomando o modelo mínimo proposto por Ansari como modelo padrão.

Também estudou-se a dependência com a temperatura da relaxação spin-rede para MbNO. Os resultados foram ajustados usando dois modelos: T^n e $e^{-\Delta/T}$. Os resultados podem ser correlacionados às mudanças entre duas geometrias em equilíbrio, sem poder distinguir o tipo de processo.

Abstract

The Q-band EPR spectra of nitrosyl hemoglobin (HbNO) and nitrosyl myoglobin (MbNO) were studied as a function of temperature between 19 K and 200K. The spectra of both nitrosyl hemoproteins show two classes of variation as function of temperature. The first can be associated to the existence of two paramagnetic species, one with rhombic symmetry and the other with axial symmetry. The second variation was observed by the changes on the g-factors and linewidths values of each specie. For the rhombic specie the change in the g value can be associated to the orientation change of the N(histidine)-Fe-N(NO) and for the axial specie to the change in the distance between Fe and N of the proximal histidine (F8). Both variations were reproduced by computer simulation.

The changes were correlated with conformational substates inside of the minimal model proposed by Ansari.

Also we studied the temperature dependence of spin-lattice relaxation in MbNO. The results were fitted with both T^n and $e^{-\Delta/T}$ models. They can be correlated to the orientation change between two geometries in equilibrium, without can identify the relaxation mechanism.

Sumário

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Introdução	1

CAPÍTULO 1.- HEMOGLOBINA E MIOGLOBINA

1.1.- INTRODUÇÃO	3
1.2.- HEMOPROTEÍNAS	6
1.2.1.- <i>Mioglobina</i>	8
1.2.2.- <i>Hemoglobina</i>	10
1.3.- ESTRUTURA TENSA E RELAXADA	14
1.4.- NITROSIL HEMOPROTEÍNAS	16
1.5.- SUBESTADOS CONFORMACIONAIS	17

CAPÍTULO 2.-RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

2.1.- INTRODUÇÃO	21
2.2.- HAMILTONIANO DE SPIN	22
2.3.-DEPENDÊNCIA DO ESPECTRO EPR COM A TEMPERATURA	25
2.4.- ION FE EM HEMOPROTEÍNAS	27
2.5.- EFEITO "G - STRAIN"	30
2.6.- EPR EM BANDA Q	31
2.7.- NITROSIL HEMOPROTEÍNAS	32
2.8.- MODELOS TEÓRICOS	36

CAPÍTULO 3.- PROCESSOS DE RELAXAÇÃO EM EPR

3.1.- INTRODUÇÃO.....	38
3.2.- FENÔMENO DE RELAXAÇÃO.....	39
3.3.- PROCESSOS DE RELAXAÇÃO SPIN-REDE.....	42
3.4.- PROCESSO DIRETO.....	43
3.5.- PROCESSO RAMAN.....	45
3.6.- PROCESSO ORBACH.....	47
3.7.- RELAXAÇÃO SPIN-REDE EM HEMOPROTEÍNAS.....	48

CAPÍTULO 4.- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.- PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	51
4.2.- MEDIDAS DE EPR.....	52
4.3.- SIMULAÇÃO DE ESPECTROS.....	55
4.4.- MÉTODO DE SATURAÇÃO DE ONDA CONTÍNUA.....	57

CAPÍTULO 5.- RESULTADOS

5.1.- VARIAÇÃO COM TEMPERATURA.....	59
5.1.1.- Nitrosil Hemoglobina.....	59
5.1.2.- Nitrosil Mioglobina.....	66
5.2.- ESTUDO DA RELAXAÇÃO SPIN-REDE DE MBNO.....	72

CAPÍTULO 6.- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

6.1.- VARIAÇÃO COM TEMPERATURA.....	80
6.2.- ESTUDO DA RELAXAÇÃO SPIN-REDE DE MBNO.....	91
6.3.- CONCLUSÕES.....	95
Bibliografia.....	97

Lista de Figuras

1.1.- Grupo Heme; o grupo heme se liga à porção proteica da Hb e Mb através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7.....	7
1.2.- Molécula de mioglobina	8
1.3.- Estrutura quaternária da Hb mostrando o arranjo das quatro subunidades.	11
1.4.- Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera achurada representa a posição do 6º ligante.	13
1.5.- Curvas de oxigenação para Mb e Hb em pH = 7.6, 7.4 e 7.2.	14
1.6.- Esquema do corte unidimensional do espaço conformacional, G é a energia livre de Gibbs	18
1.7.- Hierarquias de subestados conformacionais em proteínas	19
2.1.- Possíveis ocupações dos orbitais d pelos elétrons do íon Fe^{2+} e Fe^{3+}	27
2.2.- Dependência angular das funções de onda 3d.....	28
2.3.- Espectro de HbNO no estado T, mostrando a constante de acoplamento hiperfino A	33
2.4.- Variação com a potência de microonda dos espectros EPR-Banda X de HbNO em 7.5 K	35
2.5.- Estrutura eletrônica mais satisfatória em termos dos parâmetros de EPR.....	37
3.1.- Desdobramento dos níveis Zeeman.	39
3.2.- Esquema para o processo de relaxação direto.....	43
3.3.- Esquema de processo de relaxação de dois fônons (Raman).	45
3.4.- Esquema de processo de relaxação de dois fônons (Orbach).	47
4.1.- Espectrômetro EPR Bruker (ESP 300E)	52
4.2.- Espectro da cavidade a 5 K e 0.16 mW de potência.	53
4.3.- Esquema da subtração do background no espectro de MbNO a 18 K e 0.0613 mW (32 db).....	54

4.4.- Ilustração do espectro experimental (preto) junto ao espectro simulado (verde).....	56
5.1.- Espectros EPR-Banda Q de HbNO em função da temperatura	60
5.2.- Identificação das duas espécies no espectro EPR-Banda Q de HbNO...	61
5.3.- Componentes do Espectro EPR-Banda Q de HbNO em função da temperatura.....	62
5.4.- Fatores g da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura	63
5.5.- Larguras de linha ΔH da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura.	64
5.6.- Fatores g da componente axial do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura	64
5.7.- Larguras de linha ΔH da componente axial do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura.	65
5.8.- Espectros EPR-Banda Q de MbNO em função da temperatura.	66
5.9.- Componentes do espectro EPR de MbNO em 40 K.	67
5.10.- Componentes do Espectro EPR-Banda Q de MbNO em função da temperatura.....	68
5.11.- Fatores g da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura	69
5.12.- Larguras de linha ΔH da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura.	70
5.13.- Fatores g da componente axial do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura	70
5.14.- Larguras de linha ΔH da componente axial do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura.....	71
5.15.- Curva de saturação para g_{zz} da componente rômica em 25 K.	73
5.16.- Ajuste para determinar o valor da potência a meia saturação, para g_{zz} da componente rômica em 25 K.	74
5.17.- Curva de saturação para g_{\perp} da componente axial em 18 K.	74

5.18.- Ajuste para determinar o valor da potência a meia saturação, para g_{\perp} da componente axial em 18 K.....	75
5.19.- Curva que mostra a presença de um término constante em baixa temperatura.....	76
5.20.- Ajuste usando o modelo Orbach para g_{\perp} da componente axial.....	77
5.21.- Ajuste usando o modelo Raman para g_{\perp} da componente axial.....	77
5.22.- Ajuste usando o modelo Orbach para g_{zz} da componente rômbrica.....	78
5.23.- Ajuste usando o modelo Raman para g_{zz} da componente rômbrica.....	78
6.1.- Geometria e g-eixos da componente rômbrica de NO-Fe-N(histidina).....	81
6.2.- Geometria e g-eixos da componente axial de NO-Fe-N(histidina).....	81
6.3.- Fração relativa Axial/Rômbrica de HbNO e MbNO em função da temperatura.....	84
6.4.- Gráfico que mostra o mesmo comportamento da fração relativa com a temperatura, para 0.003 mW.....	85
6.5.- Diagrama que representa os estados conformacionais da Mb com seus respectivos estados geminados.....	86
6.6.- Fração da espécie rômbrica em função da temperatura.....	88
6.7.- Porcentagem de rombicidade da componente rômbrica de HbNO e MbNO.....	89
6.8.- Espectros EPR em banda Q de MbNO em função da potência da microonda em 15.4 K.....	92

Lista de Tabelas

5.1.- Valores do fator $P_{1/2}$ para as componentes axial e rômica.	73
6.1.- Diversos valores dos fatores g de diversos autores.	82
6.2.- Parâmetros de ajuste para $1/T_1$ de acordo as equações 28 e 29.....	92

Introdução

As hemoproteínas, como Hemoglobina (Hb) e Mioglobina (Mb), têm funções biológicas importantes: elas transportam e armazenam oxigênio através dos organismos. Estas funções biológicas só podem ser entendidas claramente, conhecendo a estrutura e os estados conformacionais das mesmas.

A presença do ferro na heme, permite o uso de várias técnicas físicas no estudo de hemoproteínas, devido a suas propriedades magnéticas conhecidas, em particular EPR em banda Q. Nós escolhemos a banda Q, já que a resolução dos espectros EPR de hemoproteínas melhora com respeito à banda X.

Vários autores estudaram os espectros EPR de hemoproteínas nitrosiladas, em função da temperatura e a maioria deles dá indícios da presença de estados conformacionais.

Nós estudamos duas coisas: a variação dos espectros EPR de nitrosil hemoproteínas em função da temperatura, numa faixa nunca antes estudada e o processo de relaxação spin-rede a baixa temperatura, já que ambos envolvem mudanças entre subestados conformacionais em equilíbrio termodinâmico.

No capítulo 1 é apresentada uma breve descrição da Hb e da Mb e as características do sítio ativo. Também é apresentada uma pequena revisão sobre subestados conformacionais.

No capítulo 2 apresentamos uma breve revisão de EPR e alguns trabalhos que foram feitos em hemoproteínas usando esta técnica.

No capítulo 3 se revisa a teoria de relaxação e se apresenta um pequeno resumo dos trabalhos que foram feitos no estudo da dependência com a temperatura da taxa de relaxação spin-rede.

Materiais e Métodos são apresentados no capítulo 4, ressaltando que é importante a parte de subtração do "background".

No capítulo 5 são apresentados os nossos resultados, divididos em duas partes, uma sobre o estudo da dependência dos espectros EPR da HbNO e da MbNO em função da temperatura e a outra sobre o estudo da relaxação spin-rede para MbNO.

O capítulo 6 é de discussão e conclusões.

Capítulo 1.- Hemoglobina e Mioglobina

1.1.- Introdução

Quase todas as reações químicas que se realizam nas células são catalisadas por enzimas e todas as enzimas conhecidas são proteínas. Uma célula isolada contém da ordem de 1000 tipos diferentes de enzimas, cada uma catalisando uma reação diferente. Às proteínas cabem muitas outras funções importantes, pois são as principais constituintes dos ossos, músculos e tendões, do sangue, do cabelo, pele e membranas celulares. Além disso, a informação hereditária, transmitida de geração a geração no ácido nucleico dos cromossomas, encontra sua expressão nos tipos característicos de moléculas de proteínas sintetizados pela célula. Para entender claramente o comportamento da célula viva, é necessário antes conhecer como uma variedade tão grande de funções pode ser desempenhada por moléculas, todas constituídas por uma combinação de unidades básicas que são os aminoácidos.

Os aminoácidos são aproximadamente em número de 20, que agrupados, formam longas cadeias conhecidas como polipeptídeos.

Proteínas são polímeros funcionais, com papel estrutural ou responsáveis por promover reações no sistema vivo. Tanto a capacidade de promoção, quanto a especificidade das reações executadas por proteínas são atribuídas à sua estrutura e aos estados conformacionais desta estrutura ^[1]. Do ponto de vista biológico, a especificidade é fundamental. Dentro de qualquer sistema vivo, uma célula por exemplo, são inúmeras as reações bioquímicas ocorrendo simultânea e controladamente dentro do mesmo compartimento. A regulação do funcionamento proteico depende, por outro lado, da interação entre a proteína em questão e o meio circundante. Esta interação pode ocorrer com outra proteína, íons ou pequenas moléculas e, quase sempre, envolve mudanças conformacionais adequadas ao transcurso da reação. De fato, a própria conformação estrutural depende de diversas formas da interação polímero-vizinhança.

Conhecer a inter-relação entre estrutura-conformação-atividade e o meio circunvizinho é o objetivo de todo estudo em biologia molecular. Enfim, deseja-se saber como a vida acontece a este nível.

O nível de organização mais baixo numa proteína, é a estrutura primária, que é simplesmente a sequência de aminoácidos numa cadeia polipeptídica. Forças de ligações entre aminoácidos da cadeia polipeptídica de uma proteína dão-lhe uma configuração ou configurações bastante regulares. Essas configurações constituem a estrutura secundária da molécula. Um exemplo importante de estrutura regular é a conhecida hélice α prevista por

Pauling em 1951 e confirmada posteriormente por difração de raios X em proteínas.

A existência de prolina (o único aminoácido que é usado na biosíntese de proteínas) facilita a dobra de hélices α que podem ser estabilizadas em uma estrutura tridimensional, por pontes de sulfeto formadas entre resíduos de cisteína, por pontes de hidrogênio, por forças hidrofóbicas e de Van der Waals. Esta estrutura tridimensional é conhecida com o nome de estrutura terciária da molécula e é específica para cada molécula biológica tendo um papel muito importante no seu funcionamento fisiológico.

Algumas proteínas associam suas cadeias polipeptídicas a outros tipos de moléculas pequenas e íons metálicos, formando uma classe dentre as proteínas, classe esta que passa a ser caracterizada pelo grupo não protéico. As **hemoproteínas** são exemplos deste tipo de associação. Suas cadeias polipeptídicas se ligam a uma molécula planar, a **protoporfirina** que pode estar associada a algum íon metálico, tal como Cu, Fe, Co, etc.

1.2.- Hemoproteínas

As hemoproteínas representam um grupo de proteínas de grande importância para os biólogos, bioquímicos, químicos e físicos. Para os últimos as hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, etc.) equivalem na sua utilidade ao átomo de hidrogênio em física atômica, ou do silício nas décadas 1950-1960 em física do estado sólido, transformando-se em moléculas modelo da biofísica.

O centro ativo dessas moléculas é o **grupo heme**: um íon de ferro circundado por um anel porfirínico¹ ligado à globina (cadeia polipeptídica) através de ligações iônicas com os grupos carboxilatos dos aminoácidos nas posições 6 e 7 (figura 1.1) [2]. A presença do íon é essencial para o papel biológico desempenhado pelas hemoproteínas.

O ferro é um metal com propriedades magnéticas bem conhecidas. Permite o uso de várias técnicas físicas, tais como: susceptibilidade magnética, ressonância paramagnética eletrônica, absorção ótica, espectroscopia Mössbauer, efeito Raman, ressonância magnética nuclear, etc. Conseqüentemente, tem-se conseguido uma descrição bastante razoável da estrutura eletrônica do ferro em situações próximas às fisiológicas.

¹ O anel porfirínico tem a habilidade para ligar um íon metálico em seu centro. No caso das hemoproteínas (Hb, Mb, etc.) é o ferro, na clorofila é o magnésio e na vitamina B₁₂ é o cobalto, sendo portanto capaz de realizar funções biológicas diversas, as quais dependem em grande parte do íon central (metal).

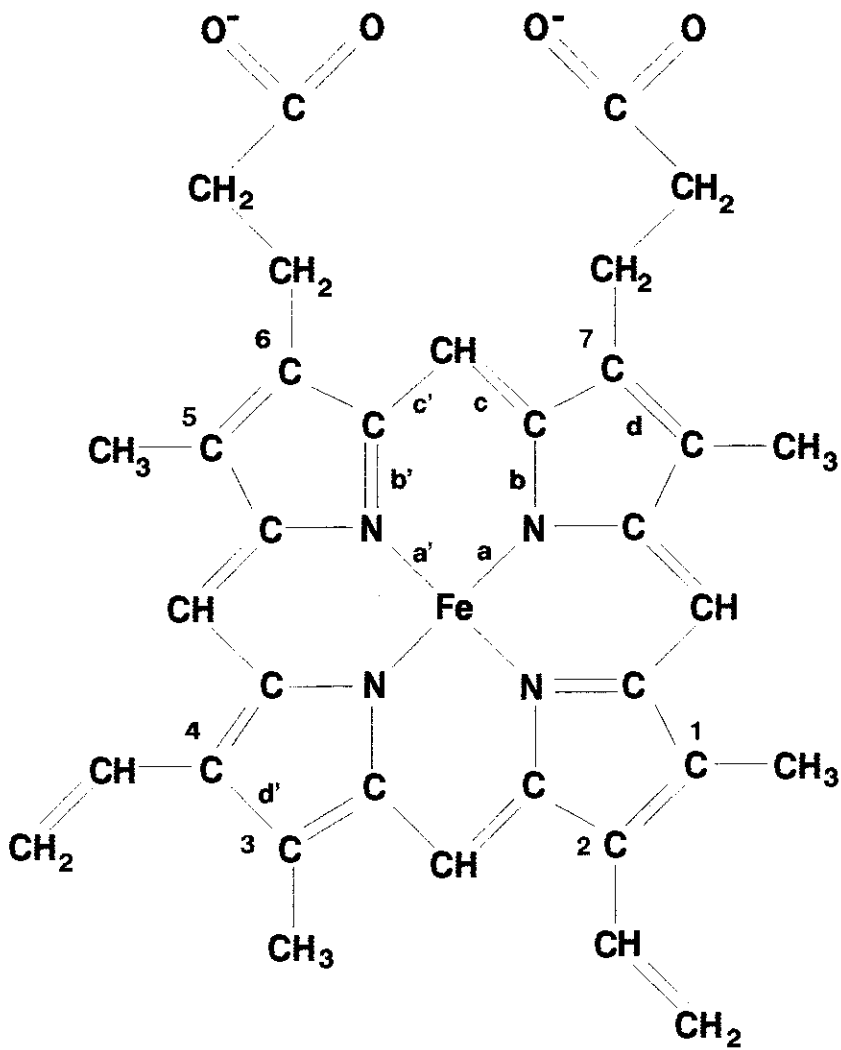


Figura 1.1.- Grupo Heme; o grupo heme se liga à porção proteica da Hb e Mb através dos grupos carboxilatos, das posições 6 e 7.

Em condições fisiológicas as hemoproteínas estão em estado oxigenado, com moléculas de O₂ ligadas ao ferro ou em estado desoxigenado, com a mesma posição desocupada. In vitro, o ferro pode ligar-se a uma variedade de pequenas moléculas como: CO, H₂O, NO, CN, etc. A carga e o estado de spin do ferro (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) dependem do ligante.

1.2.1.- Mioglobina

A mioglobina (Mb) é constituída de um grupo heme e de uma cadeia polipeptídica de 153 aminoácidos (peso molecular 17815 daltons-mioglobina de cachalote), arranjados em oito extensões de hélices α (denominadas de A a H) que formam uma fenda para o grupo heme (figura 1.2). Todas as hélices são destróginas e variam em comprimento de 7 a 26 resíduos. Dos 153 resíduos, 121 estão em região helicoidal. A molécula é um esferóide achatado nos polos, de aproximadamente $44 \times 44 \times 25 \text{ \AA}$ (Mb cachalote). É extremamente compacta sendo que existe pouco espaço vazio em seu interior.

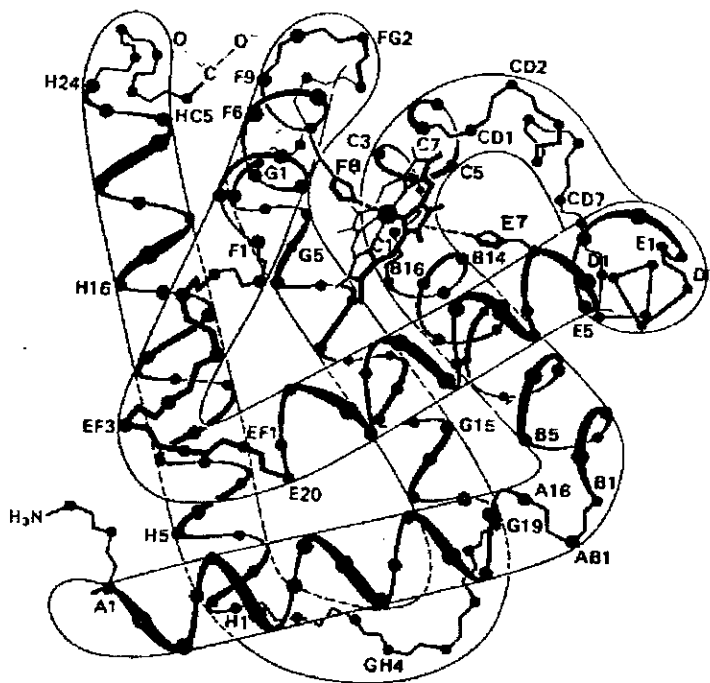


Figura 1.2.- Molécula de mioglobina [2].

O papel da Mb é ligar e armazenar oxigênio. As fontes mais ricas de mioglobina são os músculos de mamíferos aquáticos tais como focas, baleias e porcos marinhos que devem estocar O₂ por períodos relativamente longos. Foi do cachalote que John Kendrew, em 1962 obteve a Mb para a determinação da primeira estrutura por difração de raios-X da proteína [2].

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

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

1.2.2.- Hemoglobina

Dentre as mais abundantes proteínas de vertebrados, está a hemoglobina (Hb). Na corrente sangüínea existem em torno de cinco bilhões de células vermelhas (eritrócitos) por mililitro (ml), e cada uma é empacotada com 280 milhões de moléculas de hemoglobina, de peso molecular 64500 daltons (hemoglobina humana) ^[2].

A molécula de Hb tem quatro cadeias proteicas, iguais duas a duas, chamadas α e β ; na Hb humana as cadeias α contém 141 resíduos (aminoácidos) e as cadeias β contém 146, num total de 574 aminoácidos. Associados a cada cadeia existe um **grupo heme**, o centro ativo da proteína.

A Hb é uma molécula aproximadamente esférica, com uma cavidade central, e dimensões $64 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ (oxi Hb de cavalo). Os grupos heme de cadeias α_2 e β_1 são particularmente próximos, como são aqueles de α_1 e β_2 (ver figura 1.3).

O empacotamento de cadeias na molécula de Hb é tal que o contato entre cadeias laterais existe entre subunidades diferentes (α e β), mas há pequeno contato entre as cadeias iguais. Segundo Perutz ^[3] os pontos de contato entre as cadeias diferentes são por interações hidrofóbicas, enquanto entre as cadeias semelhantes são polares.

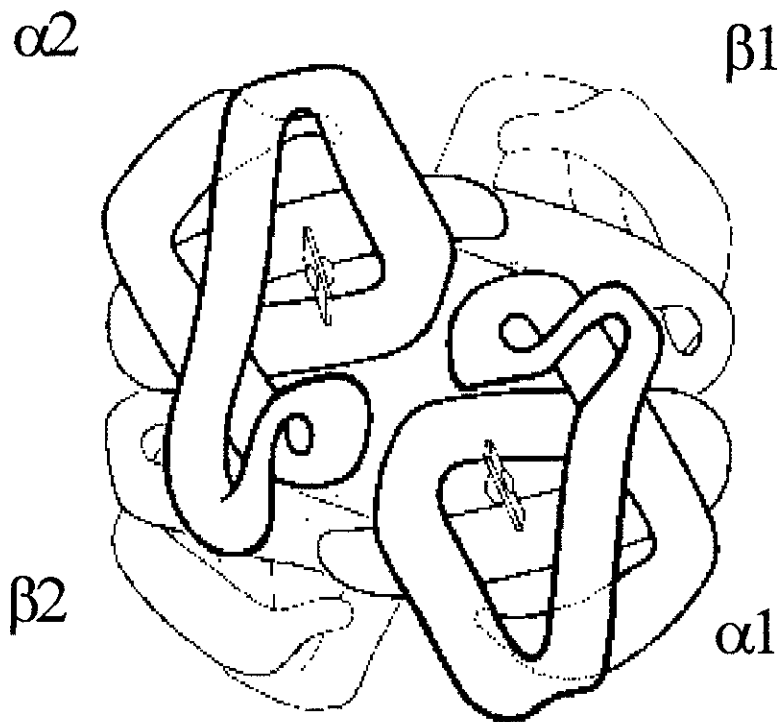


Figura 1.3.- Estrutura quaternária da Hb mostrando o arranjo das quatro subunidades ^[2].

Os contatos α e β são de dois tipos. Os $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_2 \beta_2$ são chamados contatos de empacotamento por representarem o empacotamento das subunidades que não mudam quando a molécula Hb vai da configuração desoxi para oxi. Os contatos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$ são chamados contatos de deslizamento, uma vez que sofrem as principais mudanças quando há alteração no estado de ligação do ferro do heme. Ligações de hidrogênio e pontes salinas também são importantes para manter as subunidades juntas ^[2].

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 N do grupo imidazol da histidina proximal (F8) 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 H₂O, CO, NO, etc. Ao lado do 6º ligante existe a histidina distal (E7) que está muito distante do ferro para se ligar diretamente a ele, mas pode fazer ponte de hidrogênio com o 6º ligante (ver figura 1.4).

O papel da Hb é ligar o oxigênio (O₂) no ferro da heme, nos pulmões, onde a pressão parcial de oxigênio é alta, transportá-lo através das artérias e entregá-lo nos tecidos onde a pressão parcial de oxigênio é baixa, para a ação metabólica. A Hb também desempenha papel importante ao trazer o dióxido de carbono (CO₂) dos tecidos para os pulmões, através das veias. Este gás não é trazido através de ligação com os átomos de ferro, mas é transportado pelo nitrogênio das aminas terminais das cadeias e principalmente como íon bicarbonato (HCO₃⁻) em solução [2]. O transporte do íon bicarbonato é facilitado pelo aparecimento de um grupo ácido na Hb para cada molécula de O₂ liberada. O desaparecimento nos pulmões do grupo ácido, quando o oxigênio é novamente ligado à Hb, dá início a uma série de reações que levam ao desligamento do íon bicarbonato. Reciprocamente, a presença de bicarbonatos e ácido láctico nos tecidos acelera a liberação de oxigênio [3].

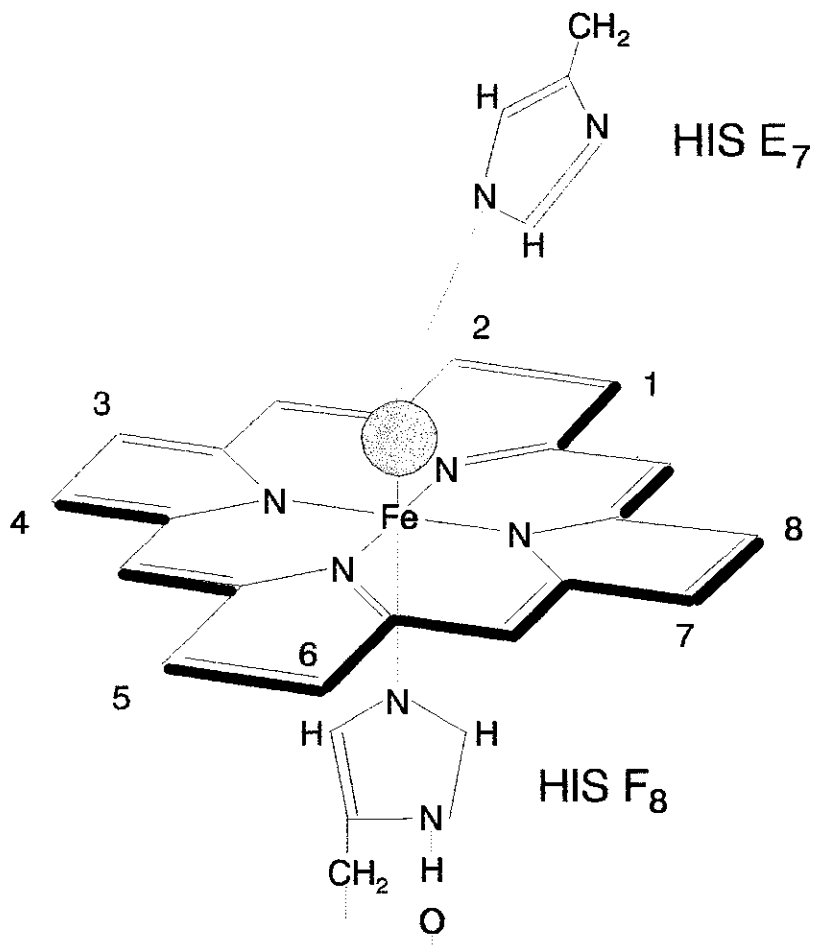


Figura 1.4.- Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera achurada representa a posição do 6^o ligante.

1.3.- Estrutura Tensa e Relaxada

Uma outra característica importante da **Mb** e da **Hb** é dada pela curva de saturação em função da pressão parcial de oxigênio (figura 1.5). Para Mb 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 ^[4].

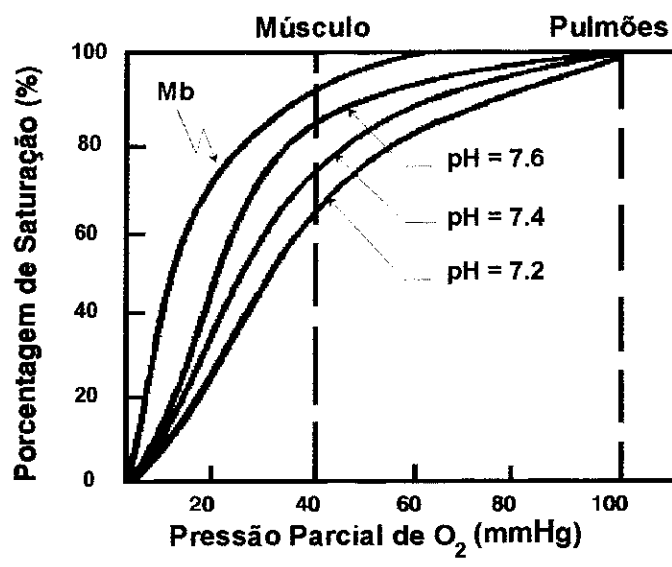


Figura 1.5.- Curvas de oxigenação para Mb e Hb em pH = 7.6, 7.4 e 7.2.

Este modelo assume que cada subunidade pode existir em duas conformações diferentes: uma T ou tensa com baixa afinidade para O₂ e outra R ou relaxada com alta afinidade para O₂. As constantes de associação para a interação do O₂ 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.

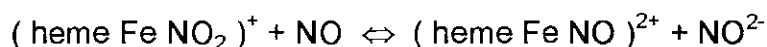
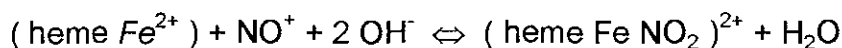
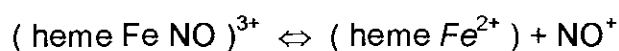
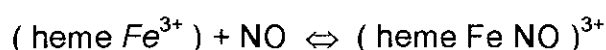
Junto com o movimento do ferro em relação ao plano da heme durante a transição da forma desoxi para oxi aparecem várias mudanças e deslocamentos de vários Å em toda a molécula. Esta é a base molecular para as tensões introduzidas quando uma molécula de O_2 se liga a Hb no estado T.

1.4- Nitrosil Hemoproteínas

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

Uma alternativa que tem sido muito usada para mimetizar a molécula de O_2 é a ligação com a molécula NO. Nesse caso o espectro de EPR observado é devido ao elétron desemparelhado do complexo $NO-Fe^{2+}$.

Keilin & Hartree, 1937, realizando medidas de absorção ótica com oxi e meta Hb, mostraram que o óxido nítrico (NO) combina-se com as duas formas da Hb. Com a oxi Hb, o composto formado é estável, sendo difícil obter novamente a Hb livre de NO. Com a meta Hb, entretanto, o composto formado não é estável, sendo que o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e o composto resultante é idêntico ao obtido com a oxi Hb ^[5]. O mecanismo proposto para a reação da meta-Hb (ou meta-Mb) com NO é o seguinte ^{[5][6]}:



Observa-se que no mecanismo proposto para cada heme (Fe^{3+}) são necessárias duas moléculas de NO para que a reação ocorra totalmente, isto é, para que ocorra a redução do ferro e a formação do nitrosil-ferroso-heme. Há também dependência do pH pois o passo c da reação requer a presença de OH^- . No caso de amostras em pó é importante a presença de H_2O ^[7].

1.5.- Subestados Conformacionais

A estrutura primária da cadeia é formada por ligações covalentes fortes que não podem ser quebradas por flutuações térmicas. A estrutura terciária é estabilizada por ligações fracas entre partes diferentes da cadeia polipeptídica. Estas ligações fracas podem ser quebradas e permitir assim movimentos extensivos. Estes pequenos movimentos da estrutura das proteínas podem estar associados a sua função. Conseqüentemente o estudo destes movimentos é relevante. Conceitos básicos para o entendimento do comportamento dinâmico das proteínas surgiram do estudo de reassociação cinética de CO em mioglobina, em conseqüência da fotólise^[8].

Propriedades em sistemas complexos, particularmente em proteínas, não podem ser descritas por valores únicos, devem ser caracterizadas por distribuições. Uma proteína se dobra rapidamente e por conseguinte não pode encontrar seu estado de menor energia. Em cada evento individual de dobra, alguma estrutura diferente será alcançada. Se

plotamos a energia de Gibbs da proteína em função de uma coordenada conformacional, resultará numa energia “landscape” desigual (ver figura 1.6). De fato a figura 1.6 dá só um corte unidimensional da energia “landscape”, altamente dimensional; mas a idéia essencial é clara: o estado fundamental da proteína é altamente degenerado. Proteínas compartilham esta propriedade com outros sistemas complexos tais como vidros e vidros de spin, mas as conseqüências desta propriedade são particularmente claras em proteínas. Cada vale na energia “landscape” corresponde a um subestado conformacional (SC).

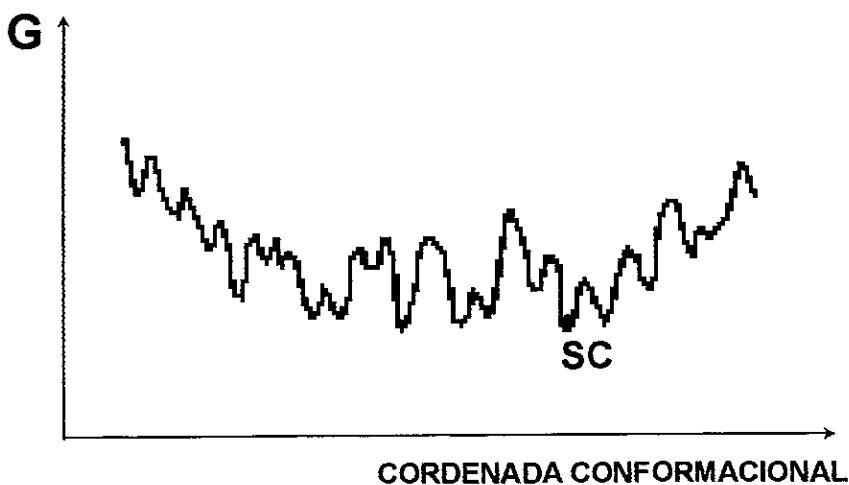


Figura 1.6.- Esquema do corte unidimensional do espaço conformacional, G é a energia livre de Gibbs ^[9].

As proteínas exibem uma energia “landscape” desigual por ter a mistura de duas propriedades dos sistemas complexos: desordem (ou não periodicidade) e frustração. Não existem condições de periodicidade que forcem a molécula a uma única estrutura; por outro lado existe frustração porque os perfis dos diferentes aminoácidos tentam ocupar o mesmo espaço

na dobra. Em consequência a proteína pode existir em um grande número de estruturas levemente diferentes.

A dependência temporal não exponencial da constante de reassociação do CO depois da fotodissociação ^[8] é só uma manifestação da existência de subestados conformacionais; também foi verificada por outros experimentos tais como: análise de estrutura por raios-X ^{[10] [11]}, espectroscopia Mössbauer ^{[12] [13]} e medidas de calor específico ^{[14] [15]}.

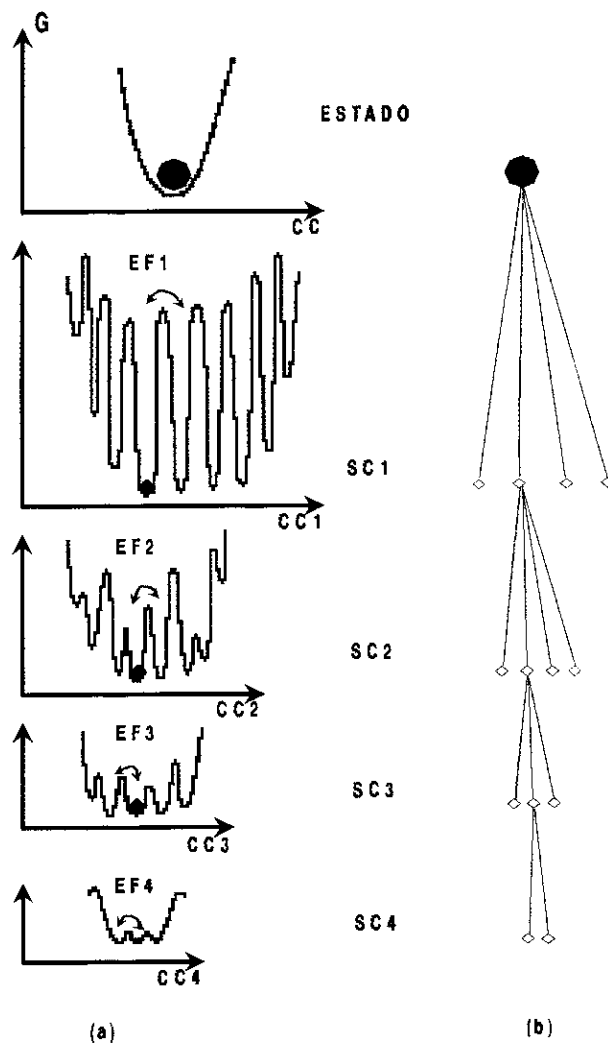


Figura 1.7.- Hierarquias de subestados conformacionais em proteínas ^[16].

A proteína estudada como protótipo, MbCO, exibe dois estados principais: a forma ligada carboxi Mb e a não ligada deoxi Mb. Cada um desses estados da proteína contém muitos SC que desempenham a mesma função biológica e que diferem em detalhes estruturais ^[9].

Nas experiências de espectroscopia infravermelho em Mb ^[16] observou-se que o arranjo dos subestados não é tão simples como o indicado na figura 1.6; foi estabelecida uma hierarquia de subestados onde cada vale da figura 1.6 está subdividido em subestados (SC1), separados por barreiras menores e novamente subdivididos (SC2). Existe uma hierarquia de subestados que se subdividem pelo menos quatro vezes (ver figura 1.7).

Também por espectroscopia de infravermelho em carbo-monoximioglobina (MbCO), foram determinadas três bandas CO principais. Estas bandas estão relacionadas a três diferentes ligações de CO e portanto a três ângulos diferentes em relação à normal da heme; em consequência no MbCO existem três subestados conformacionais maiores ^[17].

Capítulo 2.- Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

2.1.- Introdução

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) é o fenômeno de absorção de energia dos elétrons não emparelhados de um átomo, molécula ou íon quando estes se encontram sujeitos a aplicação de um campo magnético ^{[18][19]}. Assim a condição necessária para a utilização de EPR é a existência de elétrons desemparelhados no sistema em estudo. Nesse aspecto alguns dos íons dos metais de transição (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e outros), terras raras e radicais livres são adequados.

Em certos casos, como por exemplo para algumas macromoléculas (proteínas, fosfolipídios, etc), que não apresentam absorção intrínseca de EPR, é possível a introdução de moléculas chamadas "spin-label", que são radicais livres estáveis. O "spin-label" ligado à macromolécula pode refletir no seu espectro de EPR alterações relacionadas com o sistema de interesse. Os mais utilizados "spin-labels" são derivados do radical nitróxido (N-O) ^[20].

2.2.- Hamiltoniano de Spin

O momento magnético μ de um elétron desemparelhado pode ser expresso em termos de seu spin (\mathbf{S}) como:

$$\mu = -g \beta \mathbf{S} \quad (1)$$

onde β é o magneton de Bohr e g é o fator giromagnético para o elétron.

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

$$\begin{aligned} H &= -\mu \cdot \mathbf{H} \\ &= g \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{H} \\ &= g \beta H_0 S_z \end{aligned} \quad (2)$$

Este hamiltoniano descreve o efeito Zeeman e sua solução fornece as possíveis energias para o sistema. S_z é o operador correspondente à projeção do momento angular de spin ao longo da direção do campo.

A técnica de EPR consiste em pôr a amostra num 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 em conta a absorção de energia pela amostra, é dada por:

$$h\nu = g \beta H_0 \quad (3)$$

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, a principal é que os Klystrons têm frequências pouco variáveis ^[18].

As considerações feitas, até agora são válidas no caso do elétron livre para o qual o fator g vale 2,0023. Já em moléculas, o fator g depende da orientação em relação a um sistema associado à molécula e, no caso mais geral, é um tensor anisotrópico simétrico com seis componentes ^[19]:

$$\mathbf{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{xy} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{xz} & g_{yz} & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (4)$$

É sempre possível encontrar o sistema de referência adequado onde o tensor \mathbf{g} é diagonal:

$$\mathbf{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Para uma orientação arbitrária da amostra em um campo magnético obtemos a ressonância caracterizada pelo fator g :

$$g = [g_{xx}^2 \cos^2 \theta_x + g_{yy}^2 \cos^2 \theta_y + g_{zz}^2 \cos^2 \theta_z]^{1/2} \quad (6)$$

onde, por exemplo θ_x é o ângulo entre o eixo x e a direção do campo magnético e $\cos \theta_x$ é o coseno diretor de x. Em coordenadas esféricas:

$$g = [g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta]^{1/2} \quad (7)$$

Se o tensor \mathbf{g} tem simetria axial, tendo o eixo z como eixo de simetria, temos:

$$\begin{aligned} g_{//} &= g_{zz} \\ g_{\perp} &= g_{xx} = g_{yy} \\ g &= (g_{\perp}^2 \sin^2 \theta + g_{//}^2 \cos^2 \theta)^{1/2} \end{aligned} \quad (8)$$

No entanto, estudam-se casos mais complexos, onde os elétrons desemparelhados estão sujeitos a interações no átomo ou íon com os átomos vizinhos. Algumas dessas interações são: interação spin-órbita, interação hiperfina e superhiperfina.

Essas interações modificam o espectro de EPR que pode fornecer informações importantes sobre o sistema contendo o elétron desemparelhado.

2.3.-Dependência do Espectro EPR 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:

$$n_2 = n_1 \exp(-\Delta E / kT)$$

$$n_2 = n_1 \exp(-g \beta H_0 / kT) \quad (9)$$

A intensidade do espectro EPR é proporcional à 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:

$$\frac{n}{N} = \frac{1 - \exp\left(\frac{-g\beta H_0}{kT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-g\beta H_0}{kT}\right)} \quad (10)$$

A altas temperaturas, $g \beta H_0 \ll kT$, para espectrômetros de banda-Q (X), $g\beta H_0 = 1.7 \text{ K}$ (0.45 K), o termo exponencial pode ser expandido em uma série de potências, resultando:

$$\frac{n}{N} = \frac{g\beta H_0}{2kT} \quad T \geq 8.5 \text{ K} (2.5 \text{ K}) \quad (11)$$

A equação (11) mostra que a sensibilidade é inversamente proporcional à temperatura, isto significa que a absorção observada à 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.

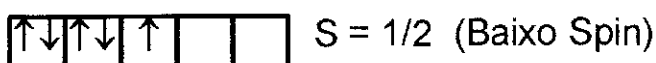
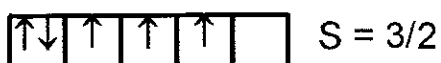
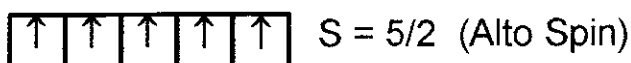
A absorção de radiação de microonda tende a igualar a população nos dois níveis, diminuindo a quantidade de energia absorvida pela amostra, ou seja, a intensidade do espectro EPR. No entanto, mecanismos de relaxação longitudinal, devidos à interação dipolar ou de troca entre os elétrons, dissipam a energia absorvida e restabelecem a distribuição de Boltzmann para a população dos níveis (será explicado mais detalhadamente no capítulo 3).

2.4.- Ion Fe em Hemoproteínas

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

A camada 3d consiste de 5 orbitais que podem acomodar no máximo 10 elétrons levando-se em conta seus spins paralelos e antiparalelos, como é requerido pelo princípio de Exclusão de Pauli. Quando há menos de 10 elétrons, vários arranjos são possíveis, como mostrado na figura 2.1. A regra de Hund favorece o estado de spin mais alto como o de menor energia, de forma que os estados fundamentais para $3d^5$ e $3d^6$ são respectivamente 6S e 5D .

FÉRRICO (Fe^{3+}).($3d^5$)



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

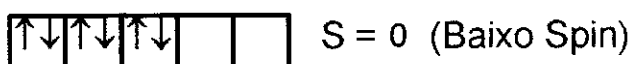
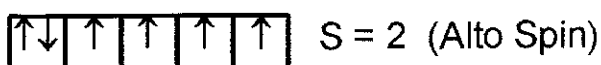


Figura 2.1.- Possíveis ocupações dos orbitais d pelos elétrons do íon Fe^{2+} e Fe^{3+} .

A dependência angular das cinco funções de onda (orbitais) 3d ortogonais são mostradas na fig 2.2.

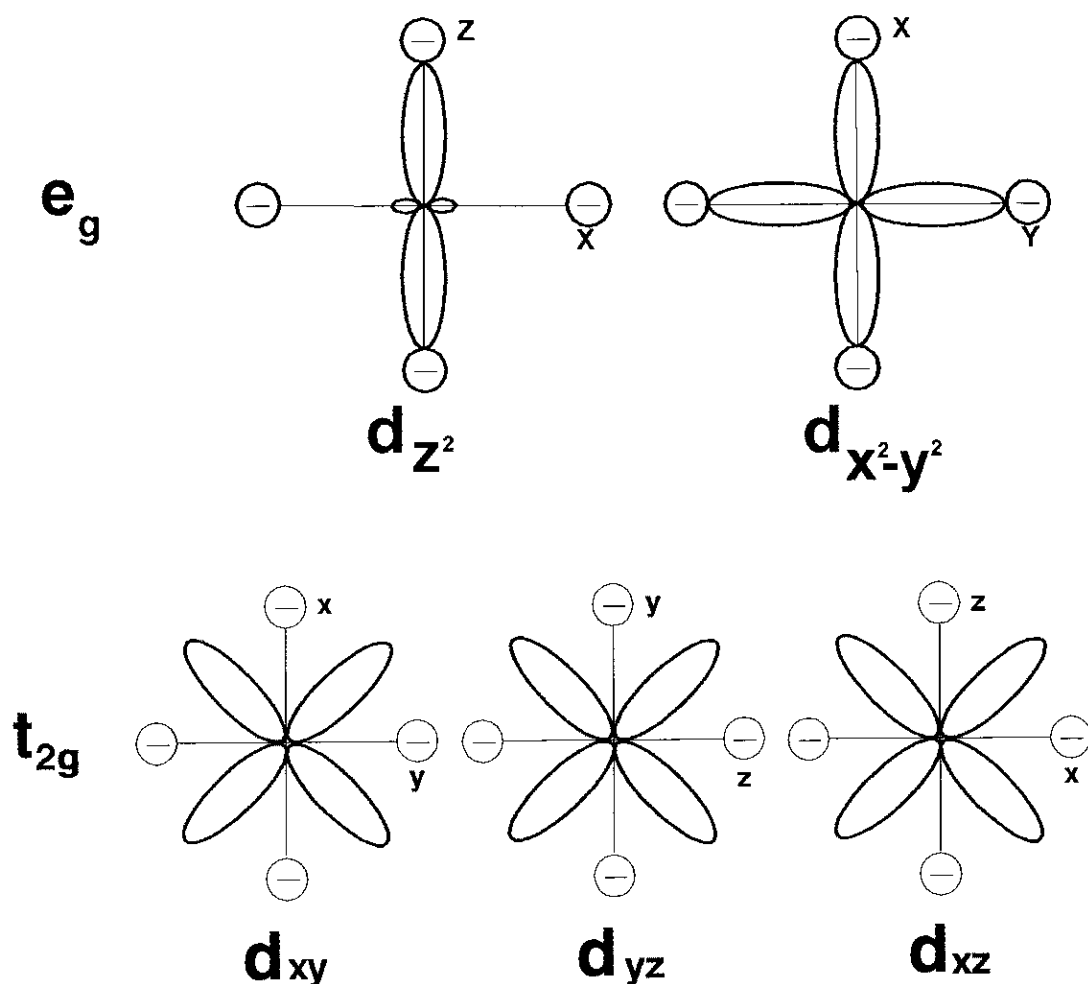


Figura 2.2.- Dependência angular das funções de onda 3d.

Os orbitais d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} são denominados t_{2g} ; e os, d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$ são chamados e_g . No íon livre a energia dos cinco orbitais é a mesma, ou seja, o estado fundamental é pentadegenerado¹. O efeito do campo cristalino não é o mesmo sobre todos os orbitais d e, sendo assim, a degenerescência é

¹ Na aproximação da teoria de campo cristalino os ligantes são substituídos por cargas pontuais negativas, que vão dar origem a um campo elétrico que atua sobre o íon paramagnético.

levantada, de modo que o desdobramento dos níveis de energia degenerados deverá ser sensível à simetria da vizinhança.

Numa primeira aproximação ao estudo do grupo heme das hemoproteínas, o íon ferro está octaedricamente coordenado a 6 ligantes carregados negativamente. Os orbitais d , no centro desse octaedro, serão desdobrados. Os três orbitais t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} e d_{yz}) evitam os vértices negativos do octaedro, enquanto os orbitais e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2}) apontam diretamente para as cargas negativas. Nesse caso, a energia de repulsão coulombiana é grande e esses orbitais (e_g) estarão com uma energia maior. A diferença de energia entre os orbitais t_{2g} e e_g é chamada de parâmetro de campo cristalino Δ . Esse valor depende do composto; em grupos heme é da ordem de 10^4 cm^{-1} [21].

Dependendo da intensidade do desdobramento do campo cristalino Δ , que levanta a degenerescência dos orbitais, pode-se ter uma configuração baixo spin ou alto spin. Assim ligantes fortes Δ intenso, como o cianeto (CN^-) resultam em uma configuração de baixo spin ($S = \frac{1}{2}$ para o Fe^{3+}) e ligantes fracos como a água e o flúor, têm uma configuração de alto spin ($S=5/2$).

2.5.- Efeito “g - strain”

Os espectros EPR de hemoproteínas são geralmente obtidos de soluções congeladas. Eles são caracterizados por um grande alargamento não homogêneo que se superpõe ao efeito de alargamento devido às diferentes orientações da molécula da amostra policristalina. Esta distribuição randômica de orientações da proteína resulta em uma distribuição dos parâmetros do hamiltoniano de spin. É amplamente aceito que as flutuações de conformação são relacionadas à distribuição de estresses exercidos pela circunvizinhança sobre o sítio ativo, e a distribuição de valores de g resultantes tem sido chamada de alargamento “g - strain” [22].

A intensidade deste alargamento pode depender do solvente. No entanto, esse fenômeno é típico do meio proteico. Quando um modelo teórico para descrever as propriedades magnéticas do centro ativo é disponível, uma simulação numérica do espectro de EPR baseado nesse modelo, deve incluir o efeito de alargamento de “g-strain”. Por outro lado, a medida quantitativa e a avaliação numérica desse efeito é por si mesmo interessante, porque ele está relacionado à flexibilidade da circunvizinhança do sítio ativo, uma propriedade que pode ser de significado funcional [23].

2.6.- EPR em Banda Q

A principal diferença entre EPR em banda X e EPR em banda Q, é a frequência da microonda; no primeiro caso ~9.4 GHz e no outro ~34 GHz. Em consequência, devido a uma maior frequência, em banda Q o efeito g-strain é maior que em banda X, de maneira que isto aumenta a largura das linhas das amostras com g-strain considerável, como no caso dos líquidos congelados.

A diferença na frequência também leva a uma maior resolução dos espectros EPR em banda Q, já que existe uma relação diretamente proporcional entre frequência e campo magnético de ressonância. Como a frequência é maior para banda Q os valores correspondentes de campo magnético também serão maiores, já que os valores de g não mudam, tendo assim uma maior separação em campo para os respectivos fatores g.

2.7.- Nitrosil Hemoproteínas

O óxido nítrico (NO), como a molécula de oxigênio (O₂), liga-se ao ferro do heme ocupando a 6^a posição de coordenação, ficando o ferro octaedricamente coordenado. Os compostos heme ferrosos (Fe²⁺) com NO são paramagnéticos e, ao contrário do caso em que os ligantes são O₂ ou CO, é possível realizar estudos através de EPR acompanhando o sinal do NO-Fe²⁺.

O hamiltoniano de spin para compostos NO-Fe²⁺ é dado por:

$$\underline{H} = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} \quad (12)$$

onde **g** é um tensor anisotrópico simétrico com seis componentes (ver eq 4), e **A** o tensor de interação hiperfina, que surge da interação entre o spin eletrônico desemparelhado e o spin nuclear (**I**) dos átomos de nitrogênio localizados ao longo da normal da heme, ou seja, N do próprio NO e o N_ε do grupo imidazol da histidina (F8) próxima.

Dependendo do número de átomos de ¹⁴N (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 R (oxi) e T (desoxi) apresentam sinais de EPR diferentes e a transição entre elas pode ser facilmente observada, variando a concentração de NO em relação ao Fe. Esta transição pode ser também induzida pelo inositolhexafosfato (IHP)^[24] ou por variações de pH^{[25][26]}

Tanto no estado R como no estado T o espectro de HbNO pode ser reconstituído pela soma dos espectros das cadeias α e β isoladas ^{[27] [28]}.

No estado R os espectros das cadeias α e β isoladas são semelhantes. Esses espectros são característicos de um sistema com simetria rômica em um estado de hexacoordenação para o ferro. Existe um desdobramento hiperfino com nove linhas, devido à contribuição do ^{14}N do grupo NO e N do imidazol da histidina (F8) próxima, que fica bem resolvido usando a técnica de detecção de terceiros harmônicos ^[29].

O espectro do estado T é mais complicado porque o espectro da cadeia β não sofre alterações em relação a forma R enquanto que o da cadeia α muda drasticamente, passando a apresentar um desdobramento hiperfino com três linhas bem resolvidas devido ao ^{14}N do grupo NO e nenhuma contribuição do N do imidazol da histidina (F8) próxima (ver figura 2.3) ^[30].

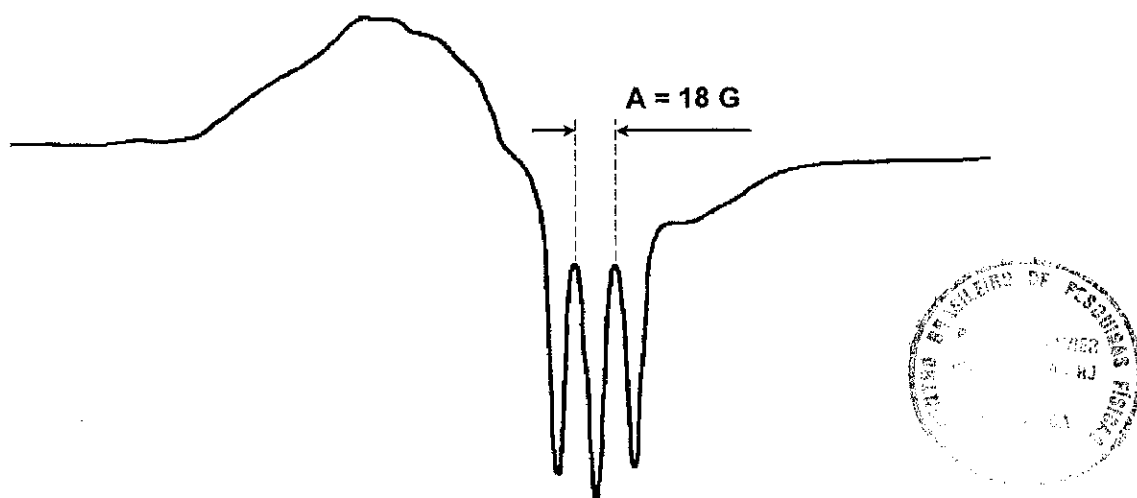


Figura 2.3.- Espectro EPR em banda-X de HbNO no estado T, mostrando a constante de acoplamento hiperfino A ^[30].

Morse & Chan ^[31] estudaram a dependência com a temperatura do espectro EPR (banda-X) na faixa entre 30 K e 180 K de nitrosil-hemoproteínas (MbNO, Im-Heme-NO, citocromo c) em solução congelada. Duas espécies em equilíbrio foram observadas, uma com tensor **g** rômico e a outra com tensor **g** axial; os valores dos tensores estão na tabela 6.1.

Hori et al ^[32], estudou o espectro EPR (banda-X) da Nitrosil Mioglobina de baleia (MbNO) e encontrou que tanto em cristais como em solução congelada, o espectro muda drasticamente quando a temperatura varia da ambiente para temperatura de nitrogênio líquido; esta mudança do espectro pode ser correlacionada com a mudança do ângulo de ligação do NO com a heme, de 153° a temperatura ambiente para 109° em 77 K.

Nascimento et al ^[33] estudara os espectros EPR (banda-X) da HbNO (*Annelidae Glossoscolex paulistus*) e MbNO (*Aplysia brasiliana*) na faixa de temperatura entre 103 K e 309 K. Para o primeiro caso encontrou que os espectros estão formados por duas espécies em equilíbrio, no outro caso só por uma.

Além disso Wajnberg et al ^[34] mostraram que os espectros EPR (banda-X) de HbNO (humana) em solução, na faixa de temperatura entre 7.5 K e 100 K são constituídos por no mínimo três espécies diferentes. Cada espectro é composto por combinações de somente duas espécies, que dependem da temperatura e da potência da microonda. Por exemplo, a baixa temperatura (7.5 K) os espectros são reproduzidos por combinação de duas espécies, uma que se apresenta em baixa potência e a outra em alta potência (ver figura 2.4).

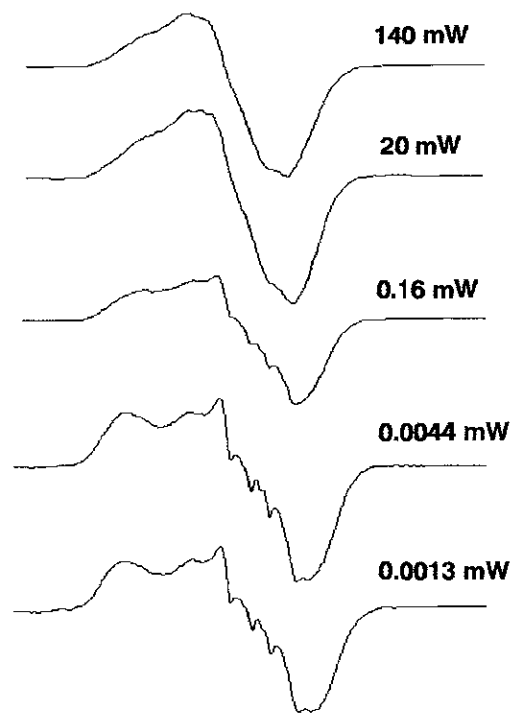


Figura 2.4.- Variação com a potência de microonda dos espectros EPR-Banda X de HbNO em 7.5 K. Os espectros em banda X tem menor resolução que em banda Q ^[34].

Hüttermann et al ^[35], usando Ressonância Dupla, Eletrônica e Nuclear (ENDOR) e EPR em banda-Q na faixa de temperatura entre 150 K e 298 K, determinou por meio de simulação teórica, que os espectros de NO-TPP-Im (humana) apresentam duas estruturas, uma axial e outra rômica. Também foi estudada a transição R-T, a qual envolve mudanças conformacionais na cadeia α , que inclui só um distanciamento parcial da histidina F8 próxima, tanto na cadeia isolada como na HbNO.

2.8.- Modelos Teóricos

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

a) Modelo π^* (d_{yz}): O elétron está em um orbital π^* , sendo as maiores contribuições do orbital d_{yz} do ferro. Em uma estrutura deste tipo são esperados grandes valores de Δg , o que não é observado em HbNO.

b) Modelo π^* (NO): Mesma estrutura que a anterior com a diferença que a densidade de spin é maior no N do NO ^[36]. São esperados constantes de acoplamento isotrópica pequena e anisotrópica grande para ^{14}N , diferente do que é observado.

c) Modelo de Doetschman: Em uma tentativa para explicar todos os valores de g e A dos vários derivados de NO-heme, foi proposto ^[37] uma estrutura que seria uma mistura de todos os níveis possíveis com as proporções relativas de cada um: π_y (0,18), π_x (0,35), d_{xz} (0,24) e d_{z^2} (0,23). Para levar em conta o acoplamento hiperfino grande de ^{14}N do NO é acrescentado o nível σ (NO).

d) Modelo σ^* : O elétron está no orbital $3d_{z^2}$ do ferro com suave delocalização no orbital N (σ) do N_e e grande delocalização no orbital NO (σ, π) ^[38], (figura 2.5).

e) Estes modelos foram propostos para uma determinada configuração do complexo Fe-NO. Waleh et al ^[39] propõem um modelo, onde consideram um equilíbrio entre dois estados eletrônicos do mesmo heme complexo (devido à variação de g), perturbados pelo resto da proteína.

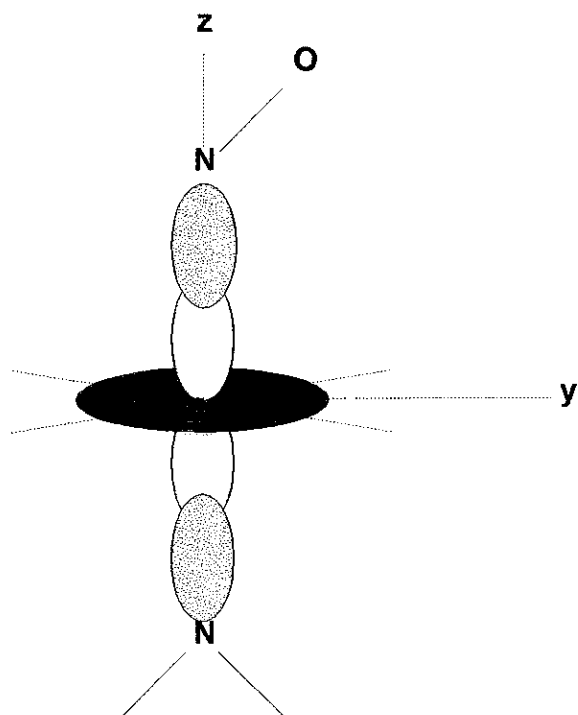


Figura 2.5.- Orbital molecular d_{z^2} do elétron desemparelhado no átomo de Fe, na ligação Fe-NO na HbNO.

Capítulo 3.- Processos de Relaxação em EPR

3.1.- Introdução

As flutuações dos momentos magnéticos eletrônicos em matéria condensada podem ser estudados por diversas técnicas, eletrônicas ou nucleares. Os processos de relaxação paramagnética mais freqüentemente encontrados em matéria condensada envolvem fónons, elétrons de condução, interações de troca e interações dipolares. Diferentes técnicas podem ser usadas para medir taxas de relaxação de diferentes faixas de valores: ressonância paramagnética eletrônica (EPR), ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia Mössbauer, dispersão de neutrons inelásticos, medida de susceptibilidade ac longitudinal e correlação angular γ - γ ^[40].

O estudo da relaxação de spins eletrônicos ou nucleares é uma ferramenta muito adequada para sistemas moleculares com movimentos. Este método é particularmente usado no estudo de líquidos, polímeros, cristais líquidos e **sistemas moleculares biológicos**. Estes últimos são caracterizados por um grande número de possíveis configurações, alta entropia e a presença de movimento browniano. Devido à ausência de simetria e regularidade nos sistemas moleculares acima mencionados, o movimento randômico é a característica mais importante ^[41].

3.2.- Fenômeno de Relaxação

Um sistema físico com íons paramagnéticos de spin $\frac{1}{2}$, em presença de um campo magnético estático H_0 , desdobra seus níveis Zeeman (ver 2.2), como se mostra na figura 3.1, com $\Delta E = g \beta H_0$.

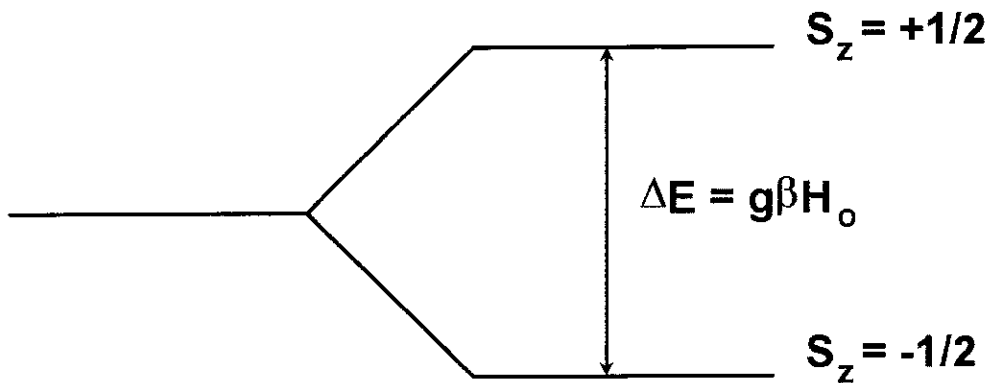


Figura 3.1.- Desdobramento dos níveis Zeeman.

Quando aplicamos a radiação, significa que estamos aplicando um campo magnético oscilante com frequência ω_0 , que varia num plano perpendicular ao campo estático. A intensidade do campo oscilante H_1 é muito menor do que o campo estático ($H_1 \approx 10^{-4} H_0$).

A energia absorvida pelos spins deve ser cedida para a vizinhança para que possa haver continuidade no processo de absorção. Se o sistema de spins não possui um mecanismo eficiente que permita ceder a energia rapidamente, as populações dos níveis envolvidos se igualam e não se observa mais o sinal de EPR. Os mecanismos responsáveis por retornar ao estado de equilíbrio são chamados de **processos de relaxação**.

Os processos de relaxação podem ser descritos fenomenologicamente, analisando a variação no tempo da magnetização \mathbf{M} , da amostra. São as **Equações de Bloch** as que descrevem a variação da magnetização com o tempo ^[42] :

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\mathbf{H} \times \mathbf{M})_x - \frac{M_x}{T_2}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\mathbf{H} \times \mathbf{M})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (13)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{H})_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1}$$

onde M_0 é o valor da magnetização em equilíbrio, depois de aplicar o campo estático, que é na direção Z.

As equações (13), nos indicam fenomenologicamente que a variação com o tempo tem duas contribuições; a primeira é devida à precessão da magnetização em torno do campo magnético estático aplicado e a segunda devida à presença da microonda (campo magnético oscilante), que tira a magnetização do equilíbrio.

Para o caso da componente na direção do campo, a recuperação de seu valor de equilíbrio M_0 é determinada pela troca de energia entre o sistema de spins e a rede através dos processos de **relaxação spin-rede**. T_1 é chamado de tempo de relaxação spin-rede ou longitudinal na equação.

No caso das outras componentes, a recuperação do valor de equilíbrio é determinada pela troca de energia entre spins do mesmo sistema,

através dos processos de **relaxação spin-spin**. O tempo característico deste processo, T_2 é chamado de tempo de relaxação spin-spin ou transversal.

Como as componentes M_x e M_y não alteram a energia magnética dos spins, podem variar sem acoplamento com a rede e portanto, em geral os processos de relaxação spin-spin são mais rápidos que os de spin-rede, ou seja:

$$T_2 \ll T_1 \quad (14)$$

Esta interação entre spins de mesma frequência de ressonância, é a que mantém o equilíbrio interno do sistema, e podemos considerar que o conjunto de spins é que relaxa como um todo cedendo energia para rede. É interessante notar que se $\Delta\omega$ é a largura das frequências de precessão (ou de ressonância) temos:

$$T_2 \propto \frac{1}{\Delta\omega} = \frac{1}{\gamma\Delta H_0} \quad (15)$$

onde ΔH_0 é a largura da distribuição de valores dos campos locais.

Existem outras formas pelas quais o sistema de spin perde a energia absorvida, como por difusão onde a energia passa do sistema de spins ressonantes para um conjunto de spins com frequência de ressonância diferente, podendo envolver uma troca de energia com a rede. Se as frequências de ressonâncias dos dois conjuntos de spins são múltiplas, pode ocorrer a **relaxação cruzada** (spin-spin), onde vários spins de um conjunto perdem energia que pode ser absorvida por um spin do outro conjunto.

3.3.- Processos de Relaxação Spin-Rede

Existem vários modelos para descrever as possíveis interações responsáveis pelos mecanismos de acoplamento spin-rede, que possibilitam a perda de energia do sistema para vizinhança. A interação responsável pelo processo é a da modulação provocada pelo fónon no potencial cristalino criado pelos átomos vizinhos do íon ligante, segundo modelo proposto por Van Vleck^[43].

Segundo o modelo de Van Vleck, um spin num campo magnético pode mudar sua direção e conseqüentemente sua energia através da absorção e emissão de fónons. A troca de energia é feita através da interação orbital-rede: o campo cristalino modulado interage com o momento orbital do íon, que por sua vez interage com o spin pelo acoplamento spin-órbita causando as transições entre diferentes estados de spin.

Os processos de relaxação spin-rede podem se dividir em dois grupos:

- Processo Direto: relaxação onde um só fónon participa
- Raman e Orbach: relaxação onde dois fónons participam

3.4.- Processo Direto

É aquele em que o sistema de spin troca energia com um só fónon de mesma freqüência que a de ressonância, aumentando em um o número de modos daquela freqüência (ver figura 3.2). Como a energia de ressonância é pequena ($h\nu \ll kT$), só fónons de baixa freqüência participam deste processo. Esta condição é sempre satisfeita para temperaturas maiores que 4.2 K, e freqüências típicas de ressonância paramagnética, onde $h\nu = 0.45$ K e 1.7 K para banda X e Q respectivamente.

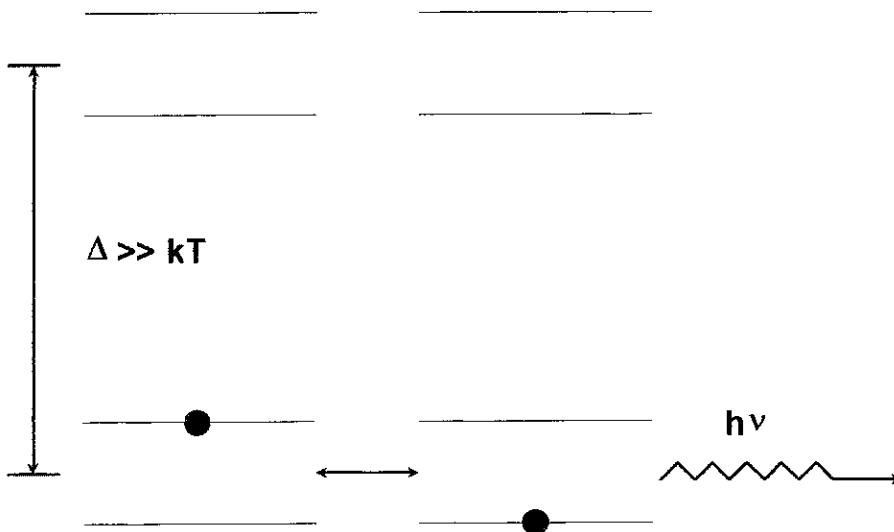


Figura 3.2.- Esquema para o processo de relaxação direto.

Consideremos um cristal com N íons paramagnéticos imersos num banho a temperatura T , sujeito a um campo magnético estático H_0 . Tomemos o nível excitado Δ suficientemente distante para que somente o dublete fundamental esteja ocupado ($\Delta \gg kT$). Se os fónons estão fortemente acoplados ao banho térmico, o número médio de ocupação de fónons $p(h\nu)$ pode ser descrito pelo fator de Bose:

$$p(h\nu) = \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (16)$$

A taxa de relaxação direta $\frac{1}{T_{1d}}$ para um íon Kramer é descrita por

[44] .

$$\frac{1}{T_{1d}} = R_0[2p(h\nu)+1] = R_0 \coth(h\nu/2kT) \quad (17)$$

onde R_0 é a taxa de emissão de fónons espontânea do estado de maior energia ($h\nu/2$), o fator 2 na equação (17) representa a contribuição do fónon de emissão estimulada e do fónon de absorção estimulada.

No limite para altas temperaturas ($h\nu \ll kT$) a taxa de relaxação direta é linear com respeito à temperatura:

$$\frac{1}{T_{1d}} = \frac{2kR_0}{h\nu} T \quad (18)$$

3.5.- Processo Raman

O processo de relaxação Raman envolve dois fónons com espalhamento inelástico. A variação de energia magnética do sistema de spin é compensada pela variação da energia vibracional entre dois modos da rede (ver figura 3.3).

Na aproximação ordinária de Debye, a densidade de estados vibracionais é dada por ^[45] :

$$\rho(\nu) = \nu^{m-1} \quad 0 \leq \nu \leq \nu_{\max} \quad (19)$$

onde m é a dimensão espectral e $\rho(\nu) = 0$ para $\nu > \nu_{\max}$. A taxa de relaxação Raman, $\frac{1}{T_{1R}}$ para um íon com um número ímpar de elétrons (íons Kramer) é então descrita por ^[45] :

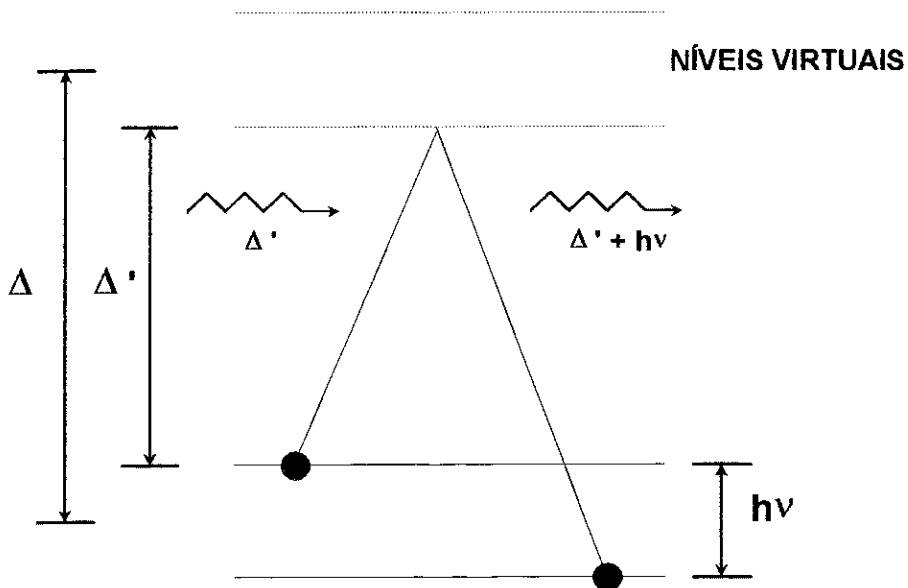


Figura 3.3.- Esquema de processo de relaxação de dois fónons (Raman).

$$\frac{1}{T_{1R}}(T)_{\infty} \int_0^{v_{\max}} \frac{(v^{m-1})^2 v^4 \exp(hv/kT) dv}{[\exp(hv/kT)-1]^2} \quad (20)$$

Esta expressão pode ser reescrita em termos de uma integral de transporte:

$$\frac{1}{T_{1R}}(T) = C T^{3+2m} \int_0^{\Theta/T} \frac{x^{2+2m} \exp(x) dx}{[\exp(x)-1]^2} = C T^{3+2m} J_{2+2m}(\Theta/T) \quad (21)$$

onde $x = hv/kT$, $v_{\max} = k\Theta/h$ sendo Θ a temperatura de Debye. A temperaturas suficientemente menores que Θ , a expressão integral para a taxa de relaxação Raman se reduz a uma simples potência de T .

$$\frac{1}{T_{1R}}(T) = C T^n J_{n-1}(\infty) = C_{\infty}^n T^n \quad (22)$$

onde $n = 3 + 2m$.

A dimensão espectral m corresponde normalmente à dimensão euclidiana d do espaço cheio pela estrutura da rede periódica do íon paramagnético. Quando $m = d = 3$, as equações (19) e (22) se reduzem às expressões bem conhecidas em teoria do estado sólido, de uma densidade v^2 de estados vibracionais correspondentes a uma taxa de relaxação Raman T^9 . Neste caso o processo é chamado de Raman normal e é comumente apresentado em cristais.

Experimentos ^[46] ^[47] em hemoproteínas (baixo spin) e ferredoxin, a baixas temperaturas (4-20 K) mostram um comportamento anômalo para a taxa de relaxação Raman, onde n toma valores não inteiros menores que nove.

3.6.- Processo Orbach

O processo ressonante ou Orbach é um caso particular de processo de dois fónons. Neste caso o nível de energia excitado, com energia Δ , é um nível eletrônico real e há conservação de energia a cada passo (com a absorção de um fónon de energia Δ e emissão de um com $\Delta + h\nu$).

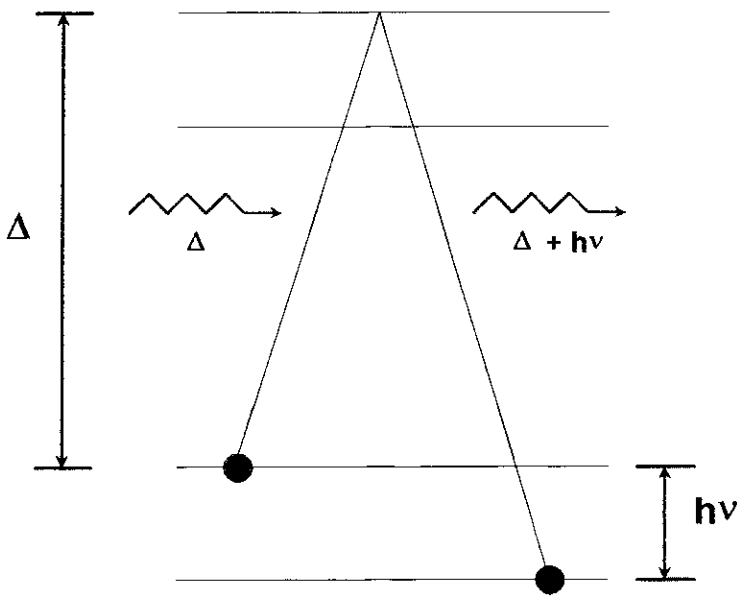


Figura 3.4.- Esquema de processo de relaxação de dois fónons (Orbach).

Para um processo Orbach envolvendo um íon Kramer para o qual os níveis de energia e freqüências de transição estão bastante separados, a taxa Orbach $\frac{1}{T_1}$ pode ser escrita como ^[48] :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{4B_1B_2}{(B_1 + B_2)} \frac{1}{e^{\Delta/T} - 1} \quad (23)$$

onde B_1 e B_2 envolvem diferentes elementos de matriz. Para baixa temperatura $\Delta \ll kT$, pode-se escrever:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{4B_1B_2}{(B_1 + B_2)} e^{-\Delta/kT} \quad (24)$$

3.7.- Relaxação Spin-Rede em Hemoproteínas

Os processos de relaxação spin-rede a baixas temperaturas em hemoproteínas tem sido estudados, tanto para o caso férrico (Fe^{3+}) como para o caso nitrosilado (Fe^{2+} -NO).

Para o caso férrico, onde tem dois estados de spin, alto spin (HS) e baixo spin (LS) foi determinado o seguinte:

a) Para o estado de alto spin puro, o processo de relaxação é Orbach, onde a energia característica Δ é identificada com o desdobramento de campo zero 2D do estado 6A_1 [49].

b) Para o estado de baixo spin puro, o processo de relaxação é Raman anômalo com $n \sim 6.32$ para ferricitocromo c, $n \sim 5.68$ para ferredoxin [46] e $n \sim 6.3$ para mioglobina ácida [47].e, neste caso, foi explicado em termos da forma fractal da proteína. Stapleton e colaboradores propuseram que m , o expoente espectral da densidade de estados vibracionais, pode ser correlacionado com a dimensão fractal da proteína d [50]. No entanto, Helman et al [51] propuseram

que para explicar o comportamento anômalo com a temperatura da taxa de relaxação spin-rede, precisa-se tomar em consideração, além da estrutura fractal da proteína (cadeia polipeptídica), as ligações cruzadas (pontes de hidrogênio) entre segmentos da cadeia dobrada.

c) Para o caso em que os dois estados de spin coexistem, ambos estados HS e LS relaxam para a rede através de processo Orbach ^[52].

No caso nitrosilado ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$), Muench e Stapleton ^[53] encontraram que para Nitrosil Mioglobina (MbNO) a taxa de relaxação spin-rede a baixa temperatura (1.5-20 K) tem dependência linear em função da temperatura. No entanto, Nascimento et al ^[54], estudaram a taxa de relaxação spin-rede, em função da temperatura na faixa entre 9 K e 310 K para MbNO , em pó e solução congelada, e encontraram uma inesperada dependência com a temperatura T^n , com $n \sim 2.2$. Este resultado foi interpretado com o modelo de tunelamento entre estados localizados (TLS), correlacionado com a existência de equilíbrio entre estados conformacionais em MbNO .

O modelo de TLS ^[55] prediz uma dependência com a temperatura da forma:

$$\frac{1}{T_1} \propto T^{2+\lambda} \quad T \ll E_{\max} / k \quad (25)$$

$$\frac{1}{T_1} \propto T \quad T > E_{\max} / k \quad (26)$$

onde E_{\max} é a energia máxima do estado localizado de tunelamento e λ é o parâmetro de assimetria da barreira-dupla de potencial.

Doetschman e Utterback^[56] estudaram o processo de relaxação de HbNO em cristais, a baixa temperatura (1.6-4.2 K) e acima de 80 K, mas não determinaram o tipo de processo.

Wajnberg et al^[34] estudaram os espectros EPR de HbNO em solução, na faixa de temperatura entre 7.5 K e 104 K. Encontraram que os espectros estão compostos no mínimo de três espécies (**A**, **B** e **C**). A relaxação da espécie **A** (baixa temperatura e baixa potência) foi estudada pelo método de saturação de onda contínua e se encontrou que relaxa com mecanismo Orbach com uma energia característica de $\Delta = 28 \text{ cm}^{-1}$. Foi proposto que esta energia está relacionada à diferença entre duas geometrias diferentes do ligante na heme.

Capítulo 4.- Materiais e Métodos

4.1.- Preparação de Amostras

A **Hemoglobina humana** foi obtida de acordo com o procedimento padrão ^[57] : 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 hemolisadas com água destilada e clorofórmio (concentração final de clorofórmio: 10% v/v) durante a noite a 4°C. A solução foi centrifugada e as moléculas de Hb retiradas e estocadas a -20° C em solução com 50% de glicerol v/v em tampão Tris pH 8.5. Para retirar os fosfatos orgânicos da Hb e ajustar o pH, usamos colunas de filtração (Sephadex G-25, Sigma Co.) equilibradas com tampão fosfato 0.1M e pH 6.4.

Mioglobina de Cavalo (Sigma) foi diluída em tampão fosfato 0.1M e pH 6.4, até uma concentração final de 5 mM.

Gás de Óxido Nítrico (NO) foi preparado reagindo ácido nítrico a 30% com cobre metálico, na ausência de oxigênio, lavado em solução de KOH

e armazenado em balão contendo água destilada para evitar que pequenas quantidades de NO_2 permanecessem no gás.

Nitrosil Hemoglobina (HbNO) foi preparada através da reação da Hb desoxigenada com gás de NO, a adição do NO foi feita em atmosfera anaeróbica (N_2). **Nitrosil Mioglobina (MbNO)** foi preparada através da reação da Mb desoxigenada¹ com gás de NO, também em atmosfera anaeróbica.

4.2.- Medidas de EPR

Medidas de EPR em banda Q, foram feitas utilizando um espectrômetro modelo Bruker ESP300E (ver figura 4.1), com uma cavidade cilíndrica para baixa temperatura (ER 5106 QT), na faixa de temperatura de 5K a 200 K.

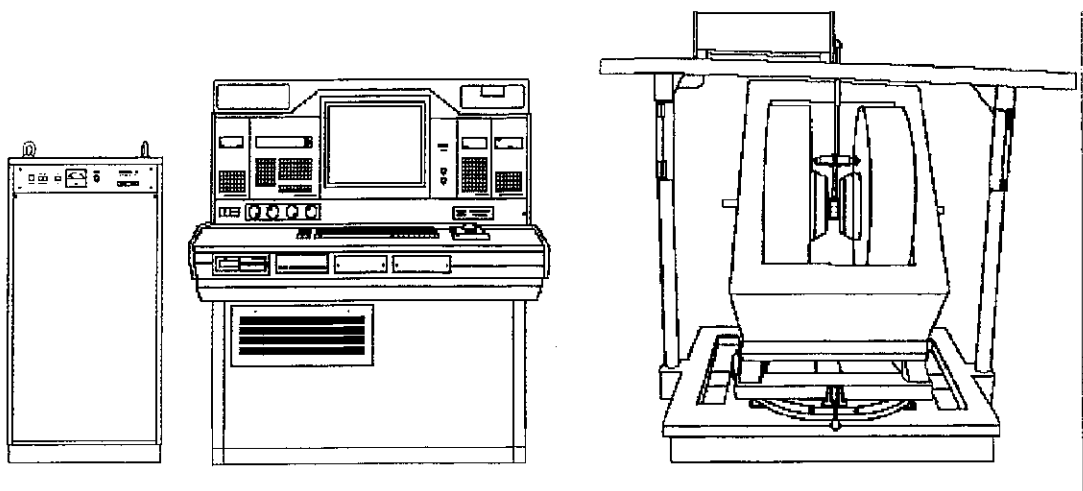


Figura 4.1.- Espectrômetro EPR Bruker (ESP 300E)

¹ A Mb é desoxigenada através da reação com ditionito de sódio enquanto que a Hb com fluxo de gás de N_2 .

A temperatura da amostra foi controlada num criostato de fluxo de hélio líquido (ER 4118 CF) para banda Q, com um controlador de temperatura Oxford ICT4. As temperaturas foram medidas com um termopar Cromel-Alumel localizado embaixo da amostra; a flutuação na leitura indica que a variação na temperatura foi de cerca de 0.1 K. Os espectros foram obtidos para diferentes potências da microonda, em cada temperatura.

Para as medidas entre 5 K e 40 K, encontraram-se certos problemas. Primeiro, a presença do sinal de Mn^{2+} mais um sinal isotrópico, devido a impurezas na cavidade; também se apresentou um sinal muito largo ("background") que não conseguimos identificar (ver figura 4.2). Os dois sinais estão presentes para toda a faixa de potência medida, o que modifica muito o espectro final. Portanto, medimos o espectro da cavidade vazia, nas mesmas condições de temperatura e potência da microonda, que com amostra.

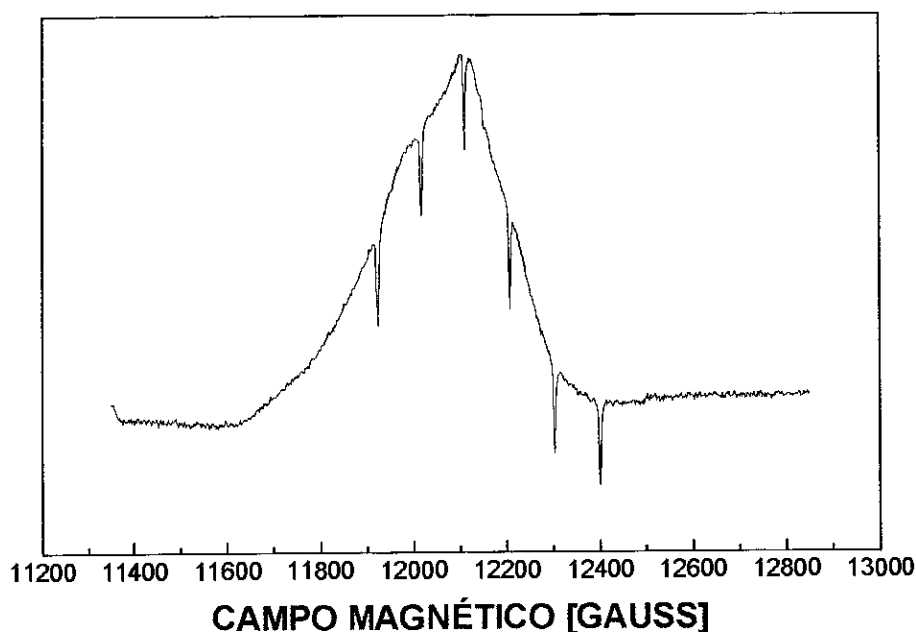


Figura 4.2.- Espectro da cavidade de banda-Q a 5 K e 0.16 mW de potência.

Os espectros da cavidade nesta faixa de temperatura mudam com a temperatura e potência da microonda; em certos casos o espectro da cavidade é maior em intensidade que a contribuição desta no espectro obtido com amostra na mesma temperatura e potência da microonda. Porque em realidade não estamos totalmente nas mesmas condições, já que o fator Q da cavidade é diferente com e sem amostra.

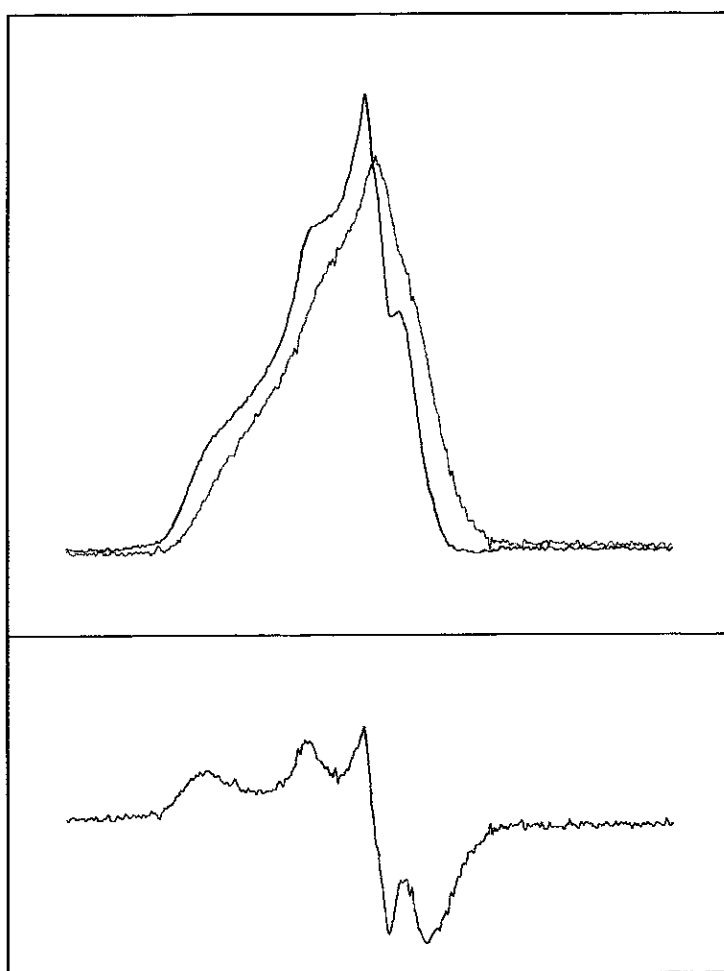


Figura 4.3.- Esquema da subtração do “background” no espectro de MbNO a 18 K e 0.0613 mW (32 db).

Para obter os espectros de nossas amostras temos que multiplicar o “background” por um fator, tal que fique adequado para o espectro com a amostra correspondente, e depois subtrair. O critério que se seguiu foi obter um espectro com a linha de base simétrica em relação à linha central (ver figura 4.3). O sinal de Mn^{2+} e o sinal isotrópico foram tirados com filtragem do espectro (transformada rápida de Fourier).

4.3.- Simulação de Espectros

Os espectros foram fitados usando o programa de simulação QPOWA ^[58] ^[59] para espectros EPR de sistemas policristalinos com íons paramagnéticos de spin $\frac{1}{2}$. Este programa permite variar uma grande quantidade de parâmetros: campo central, varredura de campo, fatores g, larguras de linha, interação hiperfina, interações superhiperfinas, interação quadrupolar e g-strain. Primeiramente a intensidade do espectro é normalizada, depois os valores dos fatores g são identificados. Então, o programa simula independentemente cada uma das componentes (porque o programa só simula uma espécie de cada vez) considerando como parâmetros fixos: campo central, varredura, interação hiperfina e g-strain. Foram considerados como parâmetros variáveis: os fatores g e as larguras de linha. As componentes são então multiplicadas por um fator de escala, somadas e o espectro resultante é comparado com o espectro experimental (figura 4.4).

Para obter as frações de cada componente, todos os espectros foram normalizados pelas suas segundas integrais.

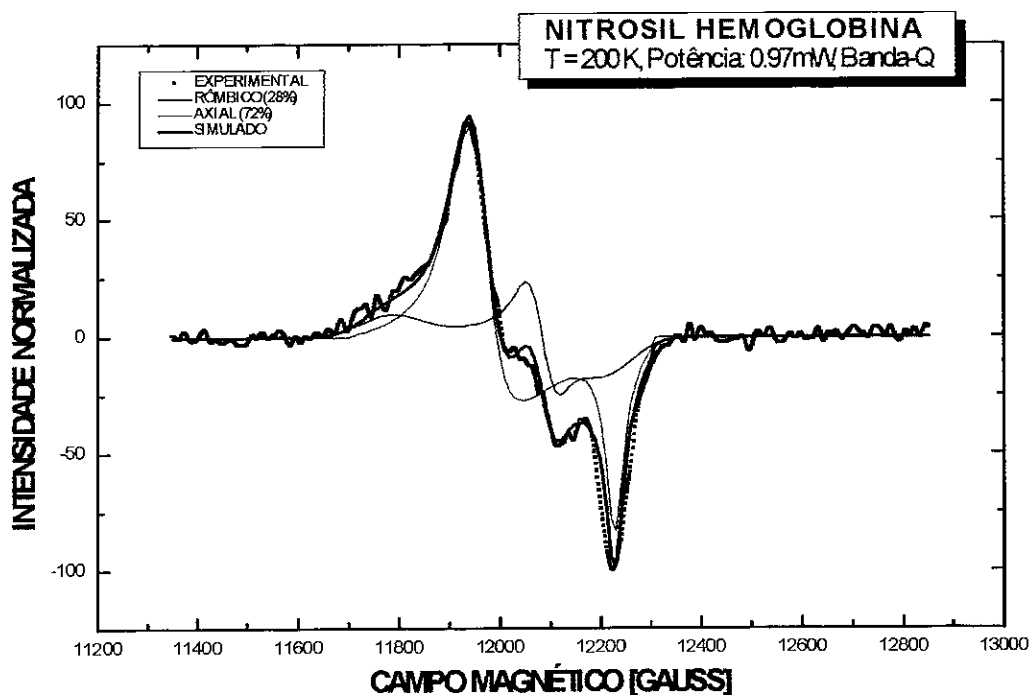


Figura 4.4.- Ilustração do espectro experimental (preto) junto ao espectro simulado (verde).

Os espectros foram ajustados considerando duas espécies: uma com simetria rômica (espectro azul) e outra com simetria axial (espectro vermelho); a soma é o espectro verde e o experimental o preto (ver figura 4.4).

A manipulação dos espectros: o cálculo da segunda integral, a filtragem do sinal de Mn^{2+} , a subtração de "background" e o ajuste de linha de base, foram feitos usando o programa Microcal Origin (Copyright Microcal Software).

4.4.- Método de Saturação de Onda Contínua

Este método dá experimentalmente o valor da potência a meia saturação, $P_{1/2}$, que é diretamente proporcional à taxa de relaxação $1/T_1$. As curvas de saturação foram analisadas para obter $P_{1/2}$ a partir de gráficos da intensidade do sinal I , e a potência incidente P na forma: $I/\sqrt{P} \times P$. O fator $P_{1/2}$ e o parâmetro de inhomogeneidade b foram determinados mediante o ajuste dos dados experimentais com a expressão:

$$\frac{I}{\sqrt{P}} = \frac{I_0}{\left(1 + \frac{P}{P_{1/2}}\right)^{b/2}} \quad (27)$$

Os ajustes foram feitos usando o programa para PC, Microcal Origin, onde I_0 , $P_{1/2}$ e b são os parâmetros variados.

Da definição de T_2 ^[18] temos:

$$T_2 = \frac{2K(b)}{\sqrt{3}\gamma\Delta H_{pp}}, \quad (28)$$

onde $K(b)$ é a razão entre a largura observada ΔH_{pp} , e a do pacote de spin ΔH_L , em função da razão de inhomogeneidade b , e $\gamma = 2\pi g\mu_B/h$.

Para determinar o valor absoluto de T_1 é preciso determinar o campo de microonda a meia saturação, $(H_1)_{1/2}$. Este é estimado a partir da seguinte expressão ^[18], usando para P os valores de $P_{1/2}$ obtidos nos ajustes:

$$\langle H_1^2 \rangle = Q_L \eta \frac{V_g}{V_a} 2 \times 10^{-3} P(G,W) \quad (29)$$

onde Q_L é o fator de qualidade, V_g e V_a os volumes da guia de onda e da amostra e P a potência incidente, η é o fator de preenchimento que depende da geometria relativa da amostra e da cavidade. Numa cavidade de modo TE_{011} (como a de banda-Q do espectrômetro Bruker ESP300E) para o caso em que a amostra está num tubo de radio r que se estende ao longo do eixo da cavidade, enchendo toda a cavidade, η é dado por:

$$\eta = 6.16 (V_a/V_c) (\lambda/\lambda_c)^2, \quad (30)$$

onde (λ/λ_c) é a razão entre o comprimento de onda no espaço livre e dentro da cavidade e V_c é o volume da cavidade. Num caso típico $(\lambda/\lambda_c)^2 = 2/3$, para o qual Q_L toma um valor aproximado de 8000. Substituindo todos estes valores na eq (29), temos:

$$\langle H_1^2 \rangle = 11.5 P_{1/2}, \quad (31)$$

considerando $V_g/V_c = 0.175$.

Portanto, T_1 pode ser estimado da seguinte equação:

$$T_1 = \frac{1}{11.5 \gamma^2 P_{1/2} T_2}. \quad (32)$$

Capítulo 5.- Resultados

5.1.- Variação com temperatura

5.1.1.- Nitrosil Hemoglobina

Na figura 5.1 são mostrados os espectros de EPR em banda Q de HbNO em função da temperatura. Os espectros foram medidos para uma faixa de temperatura entre 19 K e 200 K, para uma potência fixa de 0.97 mW (20 db) com 1.0 gauss de amplitude de modulação.

Os espectros mostram cinco linhas que podem ser associadas a duas espécies, uma com simetria rômica e a outra com simetria axial^[35]. Estas espécies foram identificadas e os seus espectros construídos computacionalmente.

A figura 5.1 mostra uma variação significativa do espectro com a temperatura. Sendo que para temperaturas altas predomina a espécie axial, e por outro lado a baixas temperaturas predomina a espécie rômica.

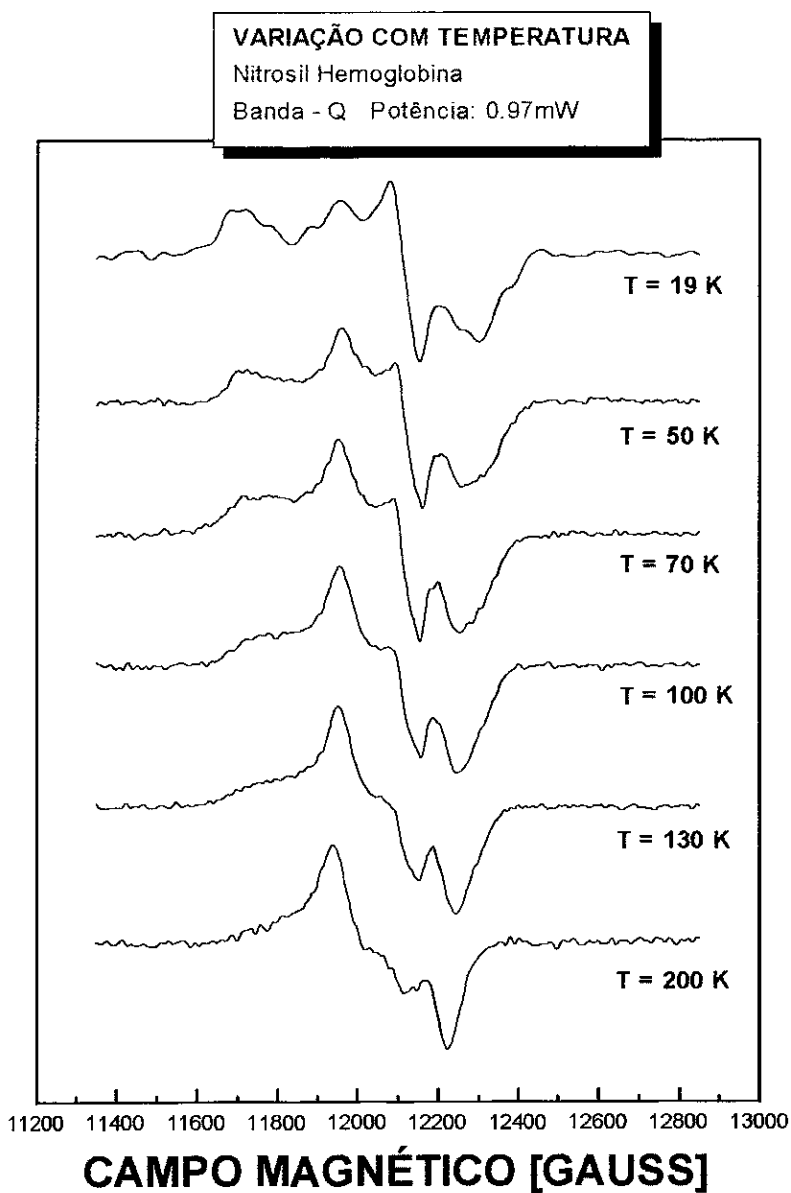


Figura 5.1.- Espectros EPR-Banda Q de HbNO em função da temperatura.

Na figura 5.2 mostra-se a posição dos fatores g que identificam as duas espécies, sendo que para uma temperatura de 70 K, os valores para a espécie com simetria rômbrica são: $g_{xx} = 2.071$, $g_{yy} = 1.978$ e $g_{zz} = 2.005$, tomando g_{zz} como valor intermediário. Para a espécie com simetria axial os valores são: $g_{\perp} = 2.027$ e $g_{\parallel} = 1.999$. Nos espectros encontrados não se resolve

as linhas hiperfinas em g_{zz} para a espécie com simetria rômbrica, como observada em banda X, porque em banda Q o efeito de g-strain é maior e conseqüentemente a resolução hiperfina é menor.

Os espectros de EPR em banda Q de HbNO foram simulados de acordo com o procedimento indicado no Capítulo 4. Na figura 5.3 são mostradas as componentes simuladas para 19 K, 70 K, 130 K e 200 K.

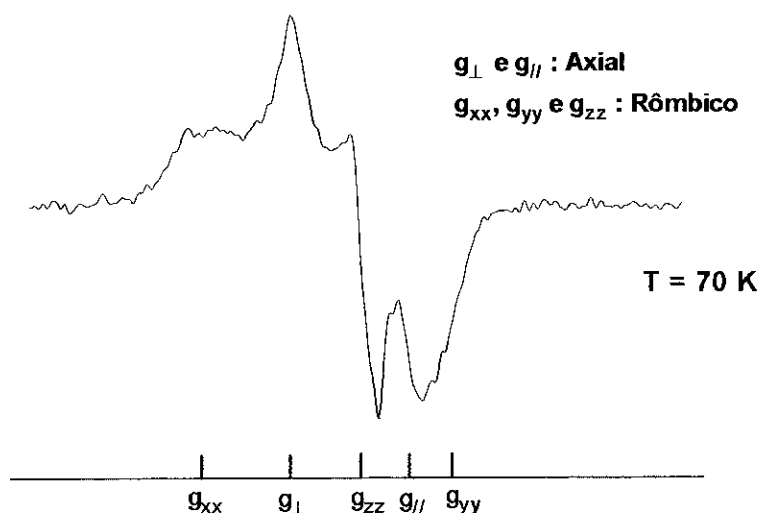


Figura 5.2.- Identificação das duas espécies no espectro EPR-Banda Q de HbNO.

Na figura 5.3 podemos observar que a fração da componente rômbrica diminui com o aumento da temperatura, além do que se observa uma mudança na forma do espectro em torno de 130 ± 10 K. A fração da componente axial aumenta com o aumento da temperatura e mostra uma mudança na forma acima de 80 ± 10 K. Estas mudanças na forma da linha se refletem nas simulações como mudanças dos valores de g e das respectivas larguras de linha (ΔH).

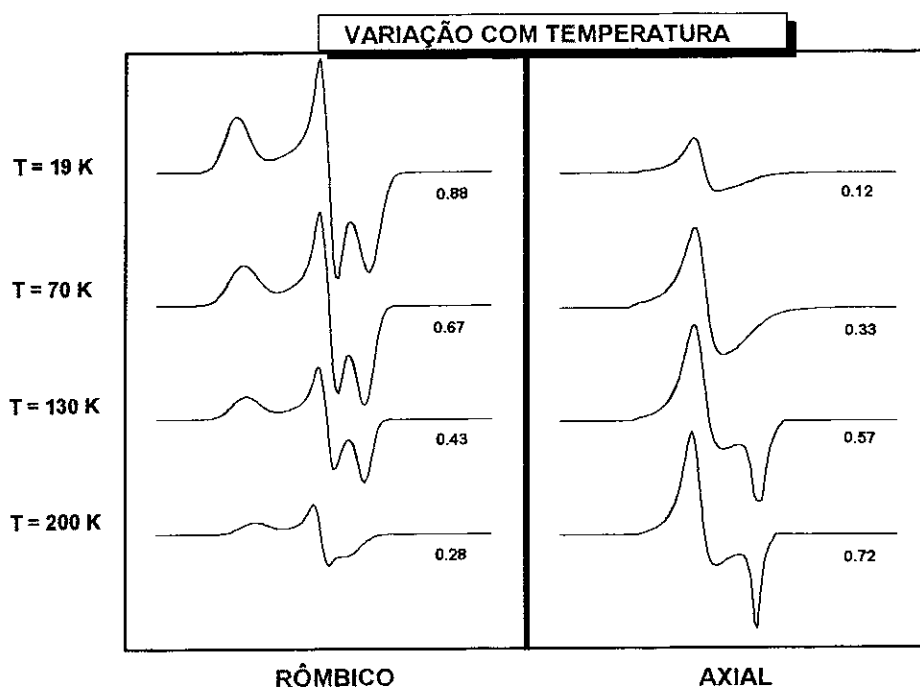


Figura 5.3.- Componentes do Espectro EPR-Banda Q de HbNO em função da temperatura.

As figuras 5.4 e 5.5 mostram a variação dos parâmetros de simulação da componente rômica (fatores g e suas respectivas larguras de linha), em função da temperatura. Pode-se observar uma variação notável para os fatores g_{xx} e g_{yy} . No caso de g_{xx} , a tendência é de diminuir com o aumento da temperatura, indo de 2.076 até 2.062; para g_{yy} , a tendência é de aumentar com o aumento da temperatura, indo de 1.974 até 1.989. Em ambos os casos, dentro do erro experimental e considerando o número de pontos experimentais, notamos que existem pelo menos duas regiões de valores estáveis. As larguras de linha tem comportamento similar.

As figuras 5.6 e 5.7 mostram a variação dos parâmetros de simulação da componente axial (fatores g e suas respectivas larguras de linha), em função da temperatura; observa-se que ambos fatores g mudam, sendo mais significativa a mudança para $g_{//}$, com uma tendência a diminuir com o aumento da temperatura, indo de 1.999 até 1.987. No caso das larguras de linha, se observa uma forte variação para $\Delta H_{//}$ com o aumento da temperatura, indo de 350 gauss em 20 K até 50 gauss em 200 K. Neste caso se apresentam claramente dois estados.

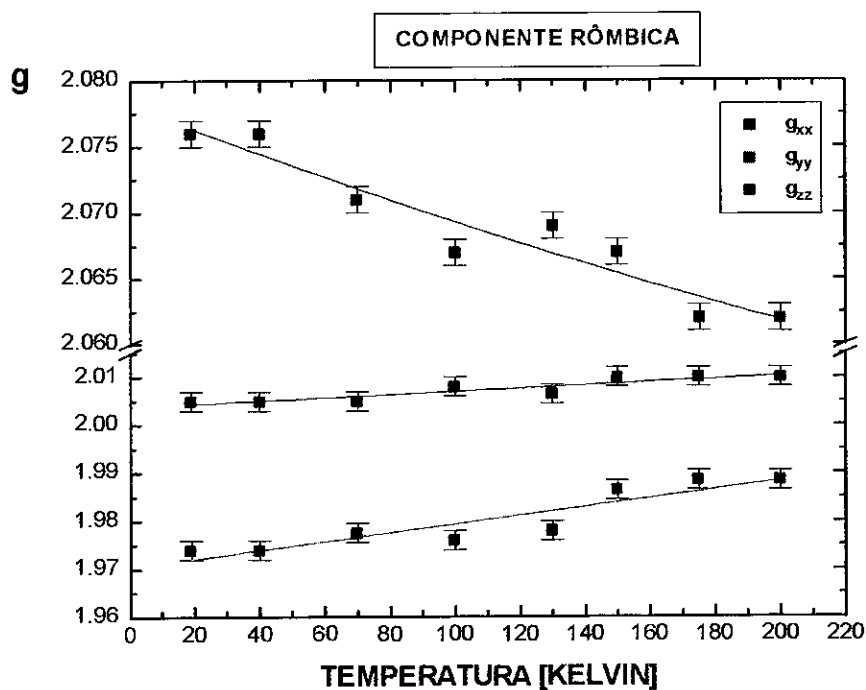


Figura 5.4.- Fatores g da componente rômbrica do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura (as curvas traçadas nesta e nas seguintes figuras são referenciais).

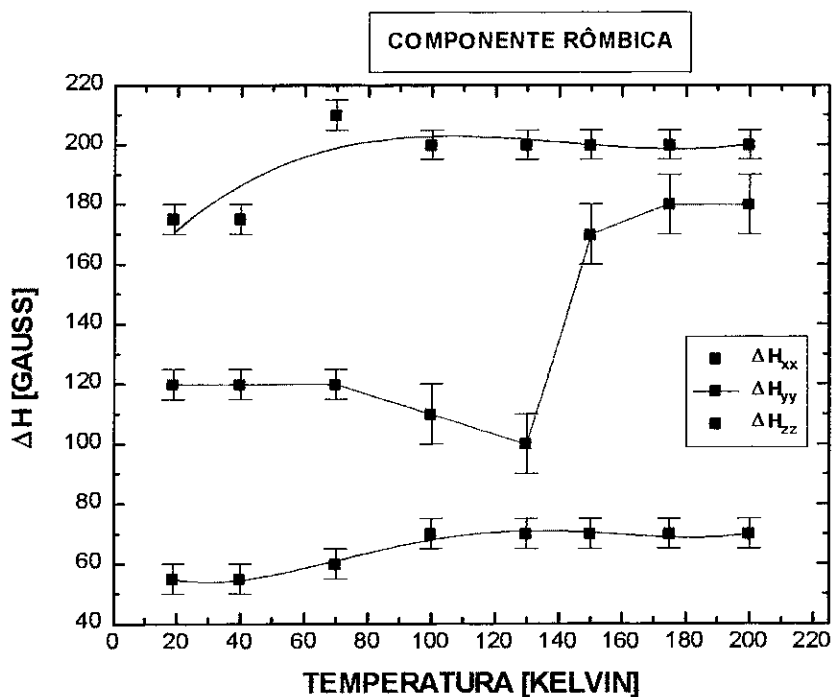


Figura 5.5.- Larguras de linha ΔH da componente rômbrica do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura.

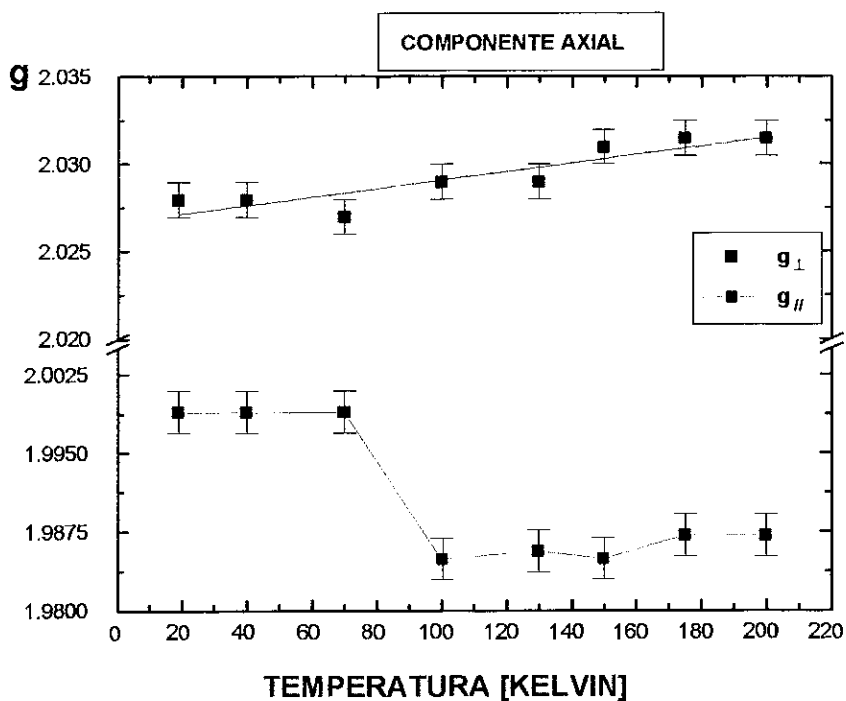


Figura 5.6.- Fatores g da componente axial do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura

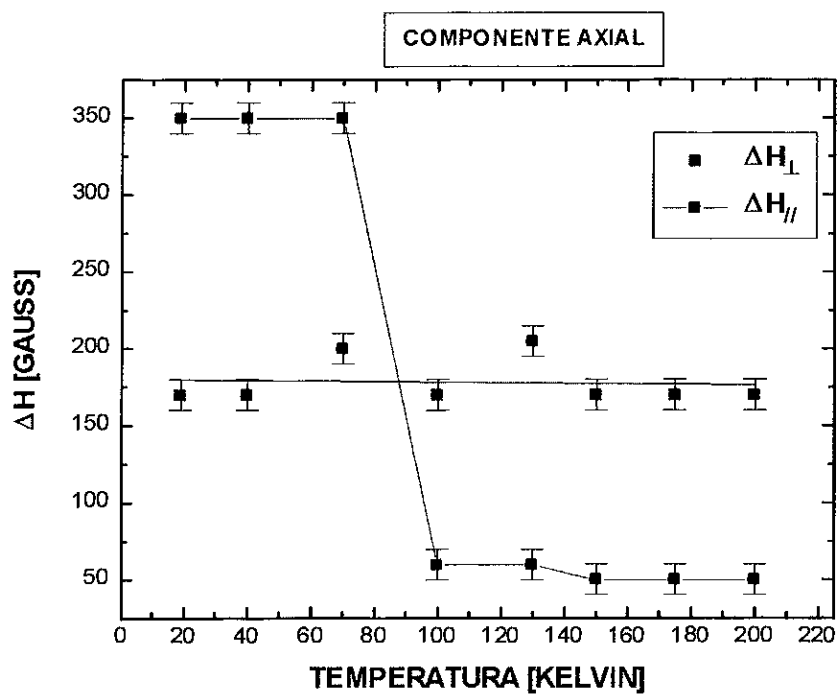


Figura 5.7.- Larguras de linha ΔH da componente axial do espectro EPR-Banda Q de HbNO, em função da temperatura.

5.1.2.- Nitrosil Mioglobina

Na figura 5.8 são mostrados os espectros EPR em banda Q de MbNO em função da temperatura. Os espectros foram medidos para uma faixa de temperatura entre 19 K e 200 K, para uma potência fixa de 0.98 mW (20 db) com 1.0 gauss de amplitude de modulação.

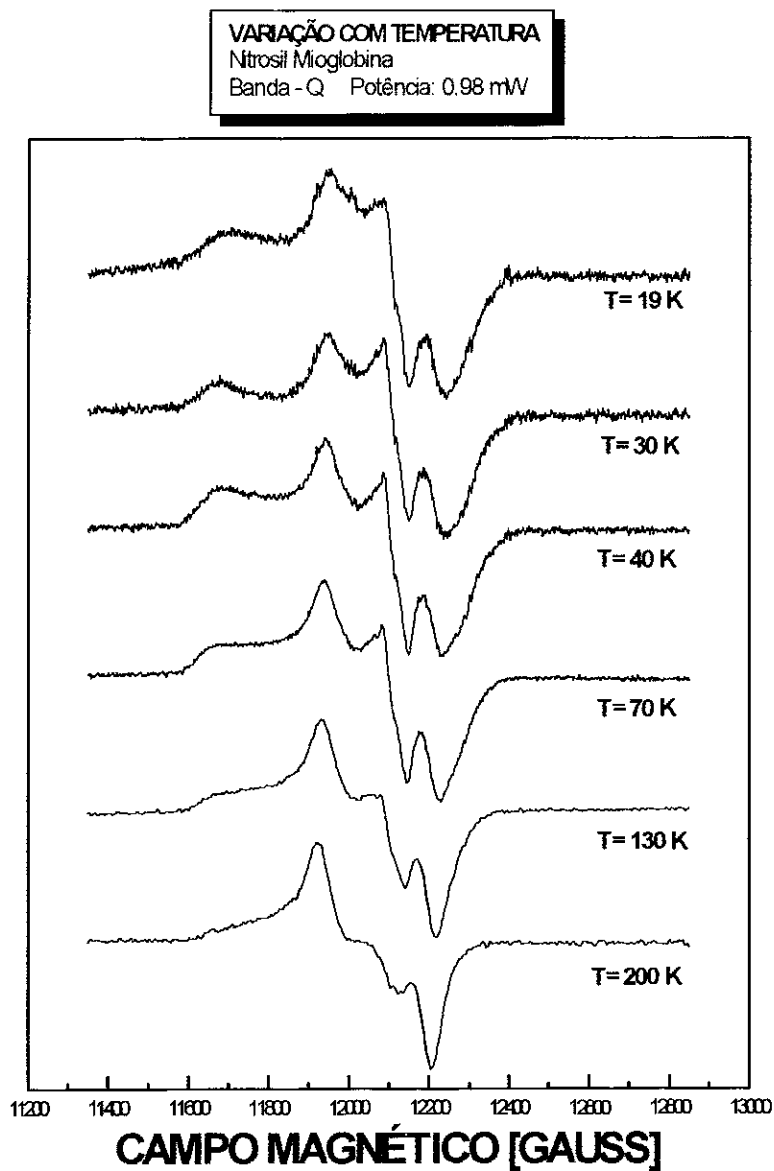


Figura 5.8.- Espectros EPR-Banda Q de MbNO em função da temperatura.

Da figura 5.8 pode-se observar que o espectro EPR de MbNO muda muito em função da temperatura. Os espectros mostram claramente uma superposição de uma espécie axial e uma componente rômbrica, como é indicado na figura 5.9, para uma temperatura de 40 K.

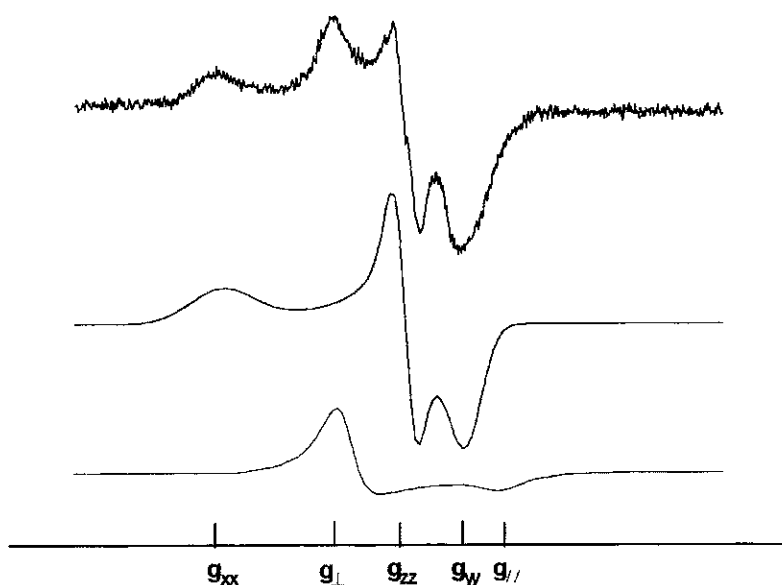


Figura 5.9.- Componentes do espectro EPR de MbNO em 40 K.

Nesta temperatura os valores dos fatores g para a espécie com simetria rômbrica são: $g_{xx} = 2.078$, $g_{yy} = 1.982$ e $g_{zz} = 2.005$ tomando g_{zz} como valor intermediário. Para a espécie com simetria axial, os valores são: $g_{\perp} = 2.030$ e $g_{\parallel} = 1.976$. Nestes espectros também não se observa a presença de estrutura hiperfina na componente rômbrica.

Os espectros EPR-Banda Q de MbNO foram simulados segundo o procedimento indicado no capítulo 4. Na figura 5.10 são mostradas as

componentes de alguns dos espectros de EPR-Banda Q de MbNO em função da temperatura.

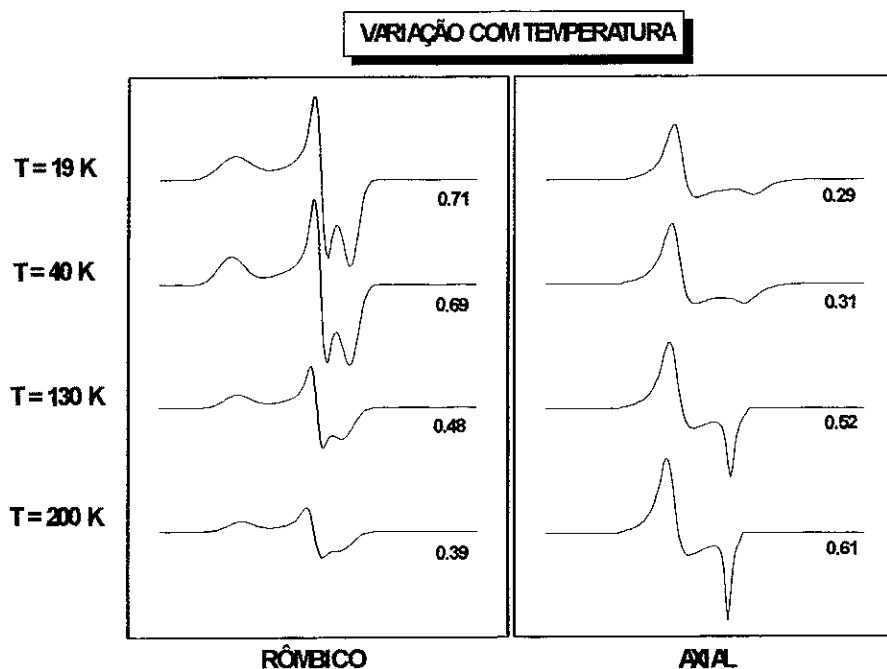


Figura 5.10.- Componentes do Espectro EPR-Banda Q de MbNO em função da temperatura.

O comportamento das frações rômbrica e axial de MbNO em função da temperatura é similar ao de HbNO. Uma diferença importante é a mudança na forma da componente axial que, no caso de MbNO, acontece em torno de 50 ± 10 K e em HbNO, em torno de 80 ± 10 K.

As figuras 5.11 e 5.12 mostram a variação dos parâmetros de simulação da componente rômbrica, em função da temperatura. Pode-se observar uma variação nos fatores g_{xx} e g_{yy} . No caso de g_{xx} a tendência é de diminuir com o aumento da temperatura, variando de 2.076 a 2.062; para g_{yy} a tendência é de aumentar com o aumento da temperatura, indo de 1.982 até

1.989. Em ambos casos se notam dois valores de equilíbrio, um para baixa temperatura e outro para alta temperatura. Para as larguras de linha se observa que ΔH_{zz} não varia, enquanto as outras duas também apresentam dois estados.

As figuras 5.13 e 5.14 mostram a variação dos parâmetros de simulação da componente axial em função da temperatura; se observa que ambos fatores g mudam, sendo mais intensa a variação de $g_{//}$, com uma tendência a aumentar com o aumento da temperatura, contrariamente ao caso de HbNO, indo de 1.969 até 1.990.

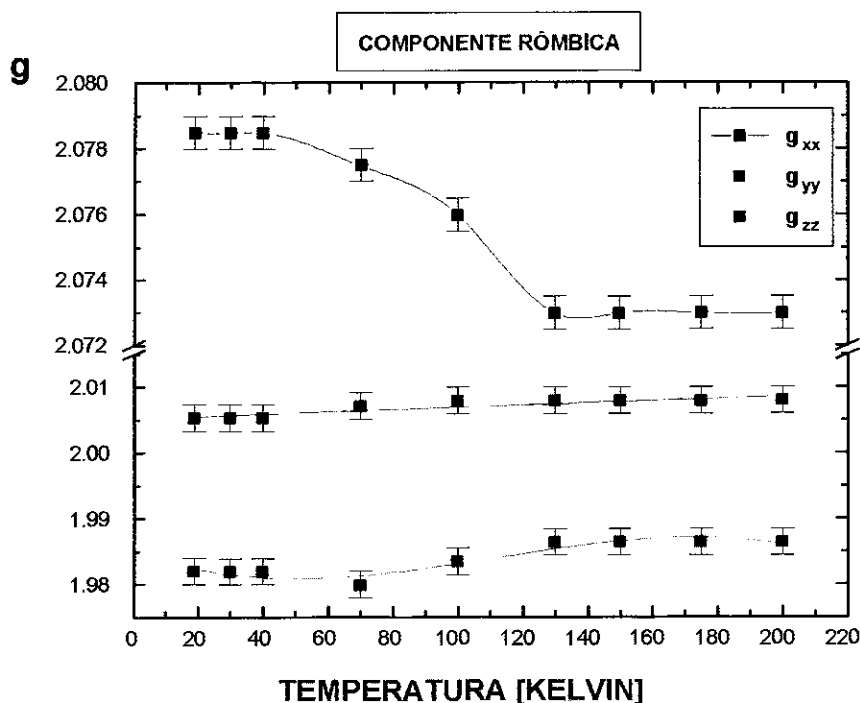


Figura 5.11.- Fatores g da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura

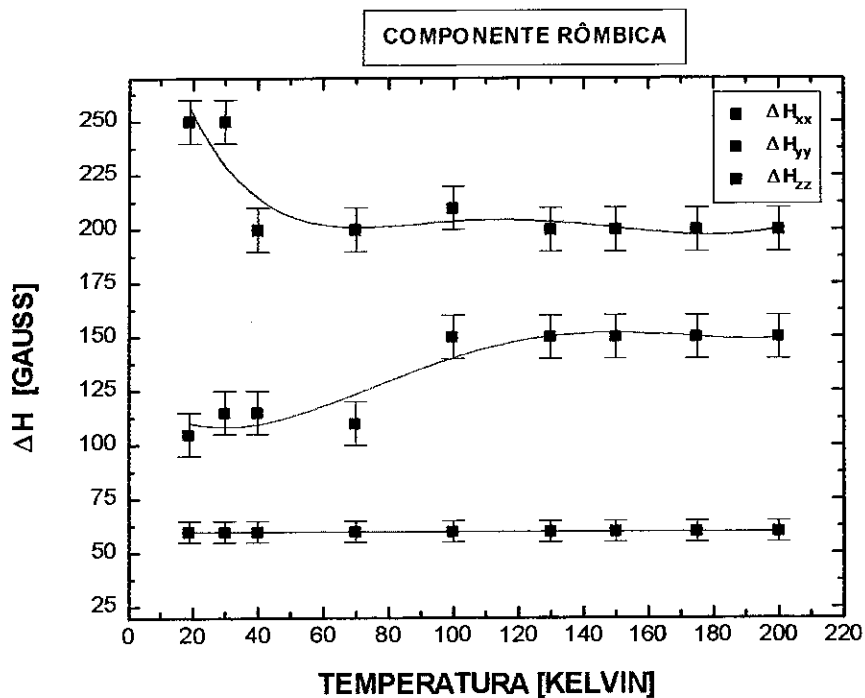


Figura 5.12.- Larguras de linha ΔH da componente rômica do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura.

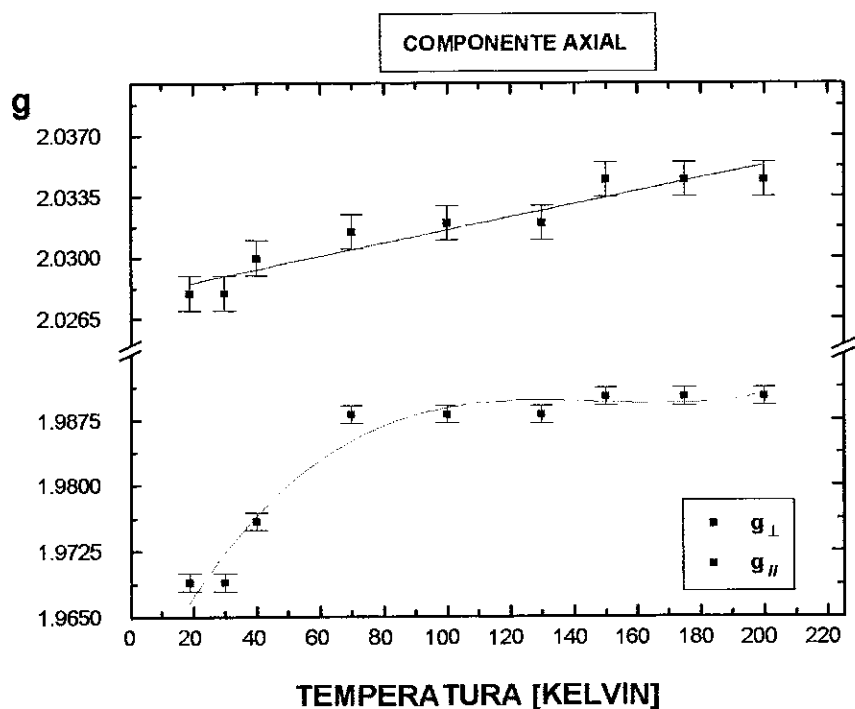


Figura 5.13.- Fatores g da componente axial do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura

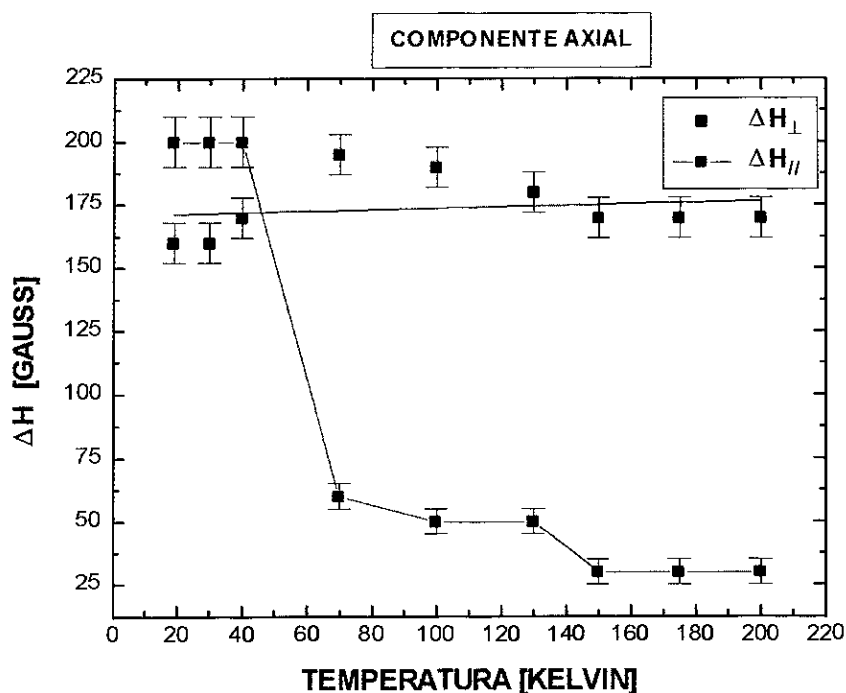


Figura 5.14.- Larguras de linha ΔH da componente axial do espectro EPR-Banda Q de MbNO, em função da temperatura.

No caso das larguras de linha observa-se uma forte variação para ΔH_{\parallel} com o aumento da temperatura, indo de 200 gauss a 19 K até 30 gauss a 200 K.

Os resultados obtidos tanto para HbNO quanto para MbNO, que envolvem mudanças nos fatores g e a suas larguras de linha, podem ser interpretados como mudanças na orientação do ligante no Fe^{2+} , para o caso rômico. Nossos resultados sugerem a existência de, no mínimo, dois estados em cada caso, que podem ser correlacionados a subestados conformacionais, como observado em MbCO com espectroscopia infravermelha^[17].

5.2.- Estudo da Relaxação Spin-Rede de MbNO

O estudo da relaxação spin-rede de MbNO foi realizado utilizando o método de saturação de onda contínua. Este método está descrito no capítulo 4. Foi feito em Banda-Q na faixa de temperatura entre 8.9 K e 33 K.

Foram estudadas as dependências com a temperatura e potência de microonda das duas componentes, axial e rômica. Para a axial acompanhou-se a intensidade da linha em g_{\perp} e para a rômica acompanhou-se a intensidade em g_{zz} . Para este fim, primeiro os espectros foram corrigidos segundo procedimento descrito no capítulo 4 e depois simulados segundo procedimento também descrito no capítulo 4.

Nas figuras 5.15 e 5.16 mostram-se a curva de saturação e a curva $\log(I/\sqrt{P}) \times \log P$ com seu respectivo ajuste, da componente rômica para 25K. Do mesmo jeito foram determinados os valores do fator $P_{1/2}$ e do parâmetro de inhomogeneidade b para 33 K, 18 K, 15.4 K, 12 K e 8.9 K.

Nas figuras 5.17 e 5.18 são mostradas a curva de saturação e a curva $\log(I/\sqrt{P}) \times \log P$ com seu respectivo ajuste, da componente axial, para 18 K. Também se determinaram os valores de $P_{1/2}$ para as outras temperaturas. Os valores para ambas componentes estão na tabela 5.1.

Tabela 5.1.- Valores do fator P_{1/2} para as componentes axial e rômica.

Temperatura (K)	Componente Axial	Componente Rômica
	P _{1/2} (mW)	P _{1/2} (mW)
8.9	0.003 ± 0.001	0.0014 ± 0.0003
12	0.0053 ± 0.0007	0.0038 ± 0.0008
15.4	0.018 ± 0.002	0.0043 ± 0.0005
18	0.044 ± 0.005	0.005 ± 0.001
25	0.050 ± 0.006	0.021 ± 0.001
33	0.26 ± 0.05	0.056 ± 0.006

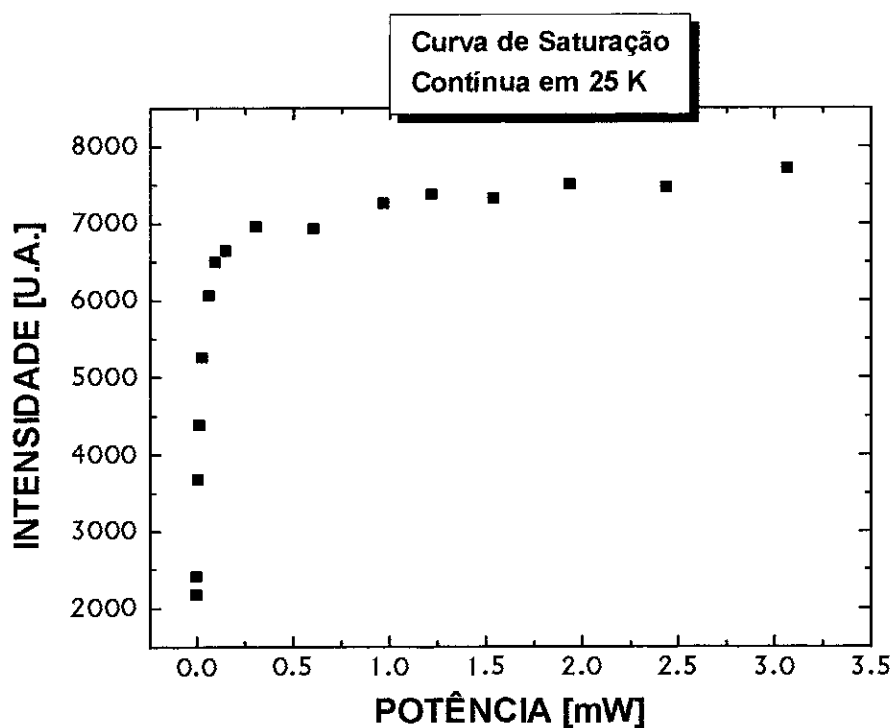


Figura 5.15.- Curva de saturação para g_{zz} da componente rômica em 25 K.

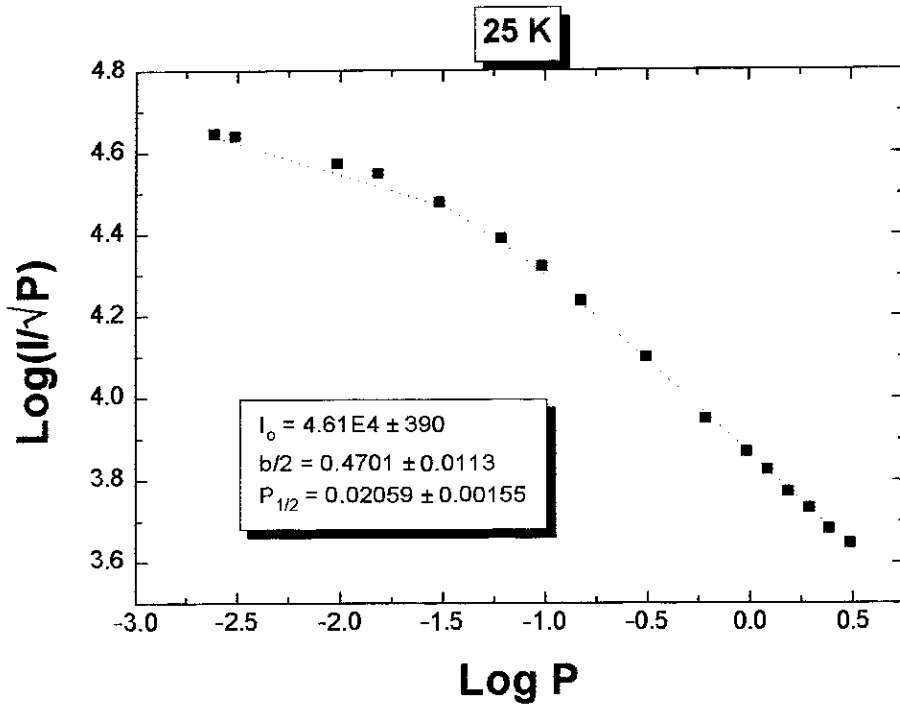


Figura 5.16.- Ajuste para determinar o valor da potência a meia saturação, para g_{zz} da componente rômica em 25 K.

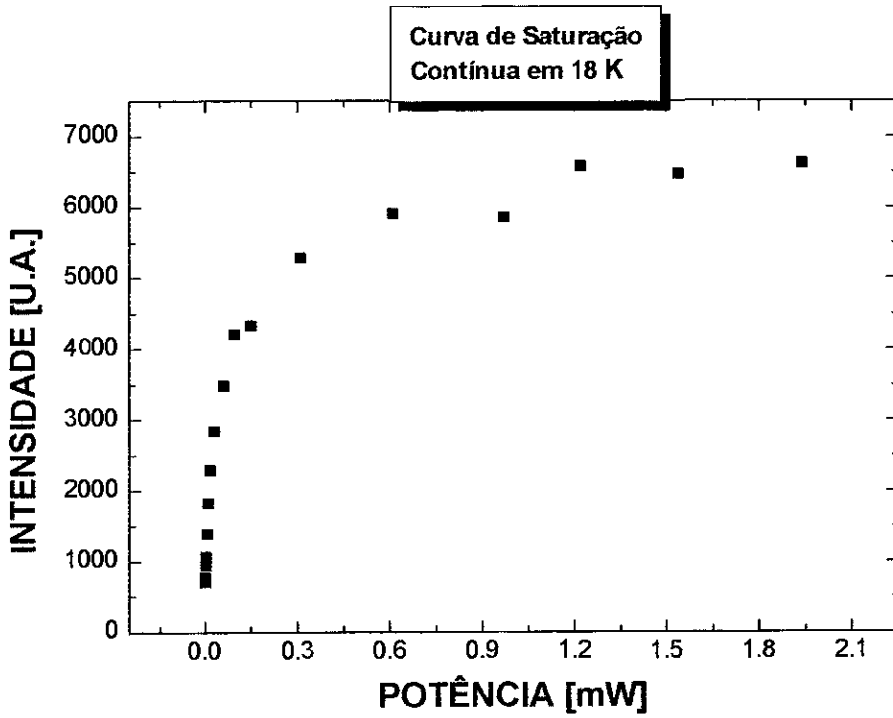


Figura 5.17.- Curva de saturação para g_L da componente axial em 18 K.

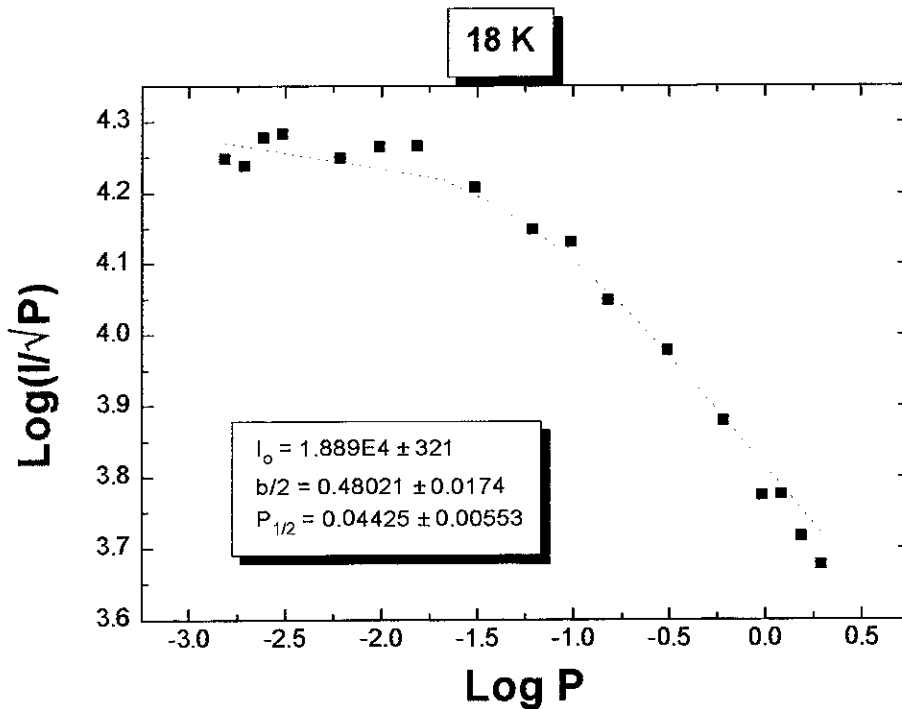


Figura 5.18.- Ajuste para determinar o valor da potência a meia saturação, para g_{\perp} da componente axial em 18 K.

Já que $P_{1/2}$ é diretamente proporcional a $1/T_1$, podemos estudar a dependência de $P_{1/2}$ em função da temperatura para identificar o processo de relaxação spin-rede (ver capítulo 4). Nossos resultados foram ajustados usando dois modelos:

$$P_{1/2} \propto A T^n + C \quad (33)$$

$$P_{1/2} \propto B \exp(-\Delta/T) + D \quad (34)$$

Onde n , A e C ; Δ , B e D são os parâmetros do ajuste. Neste caso só estamos interessados nos valores de n e Δ , já que os outros são afetados pelo fator de

proporcionalidade entre $P_{1/2}$ e $1/T_1$. O primeiro modelo corresponde a um processo de relaxação Raman e outro a um processo de relaxação Orbach.

As constantes C e D foram utilizadas, já que os resultados experimentais indicam a presença de um termo constante predominante a baixa temperatura (ver figura 5.19).

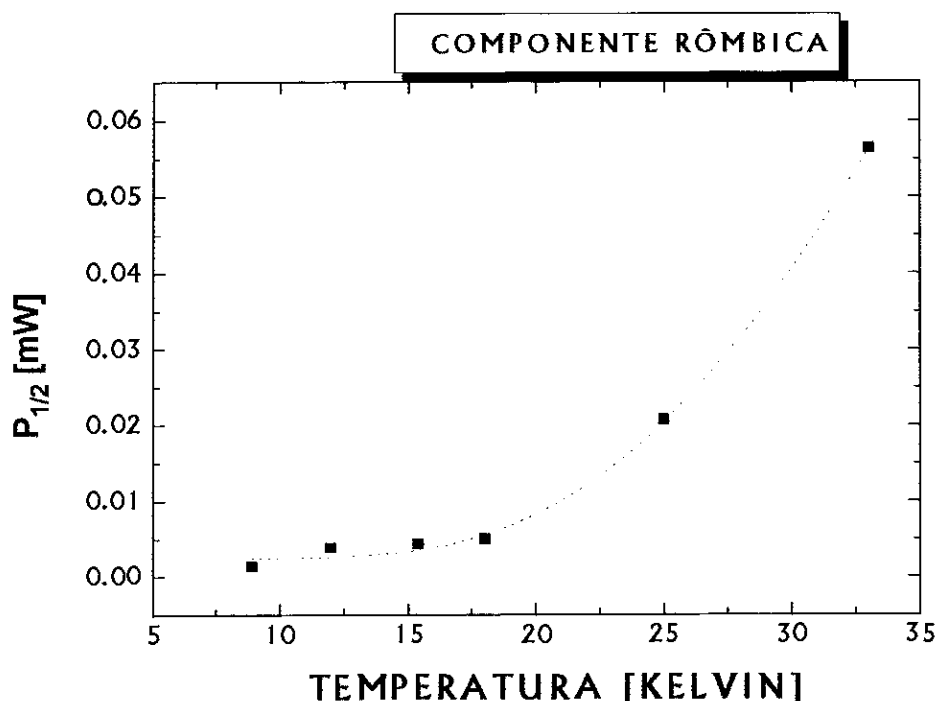


Figura 5.19.- Curva que mostra a presença de um termo constante em baixa temperatura.

Nas figuras 5.20 e 5.21 são mostrados os ajustes com os dois modelos, para a componente axial. Para a equação (34) obtém-se $\Delta = 35 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ e para equação (33) obtém-se $n = 3.2 \pm 0.4$.

Nas figuras 5.22 e 5.23 são mostrados os ajustes com os dois modelos para a componente rômica. Para a equação (34) obtém-se $\Delta = 28 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ e para equação (33) obtém-se $n = 2.7 \pm 0.3$.

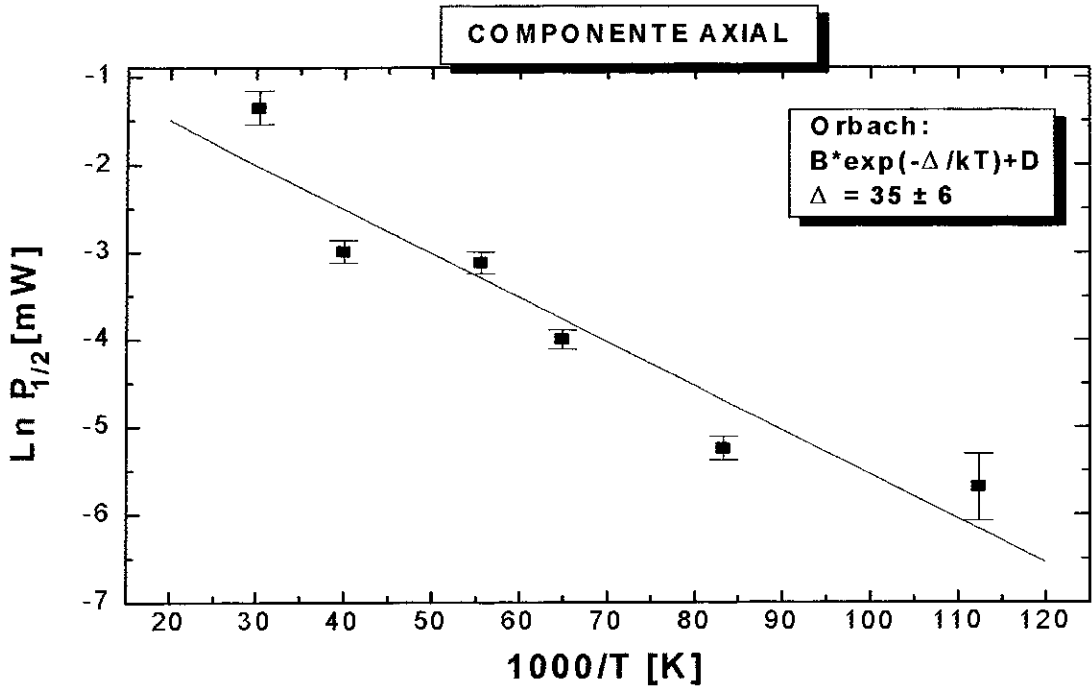


Figura 5.20.- Ajuste usando o modelo Orbach para g_{\perp} da componente axial.

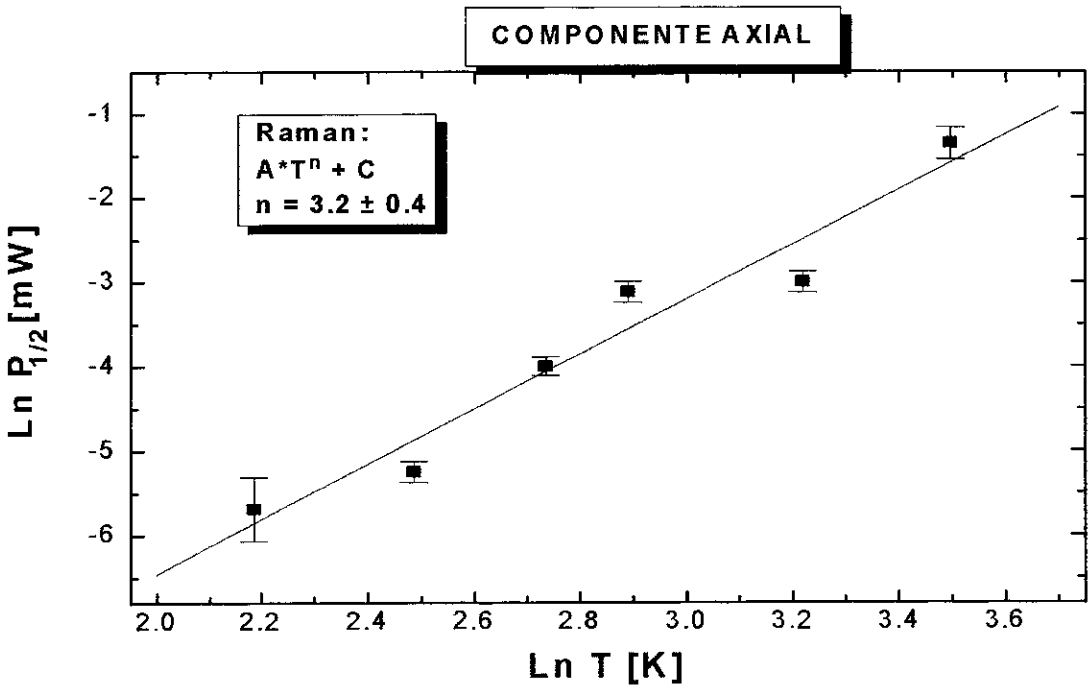


Figura 5.21.- Ajuste usando o modelo Raman para g_{\perp} da componente axial.

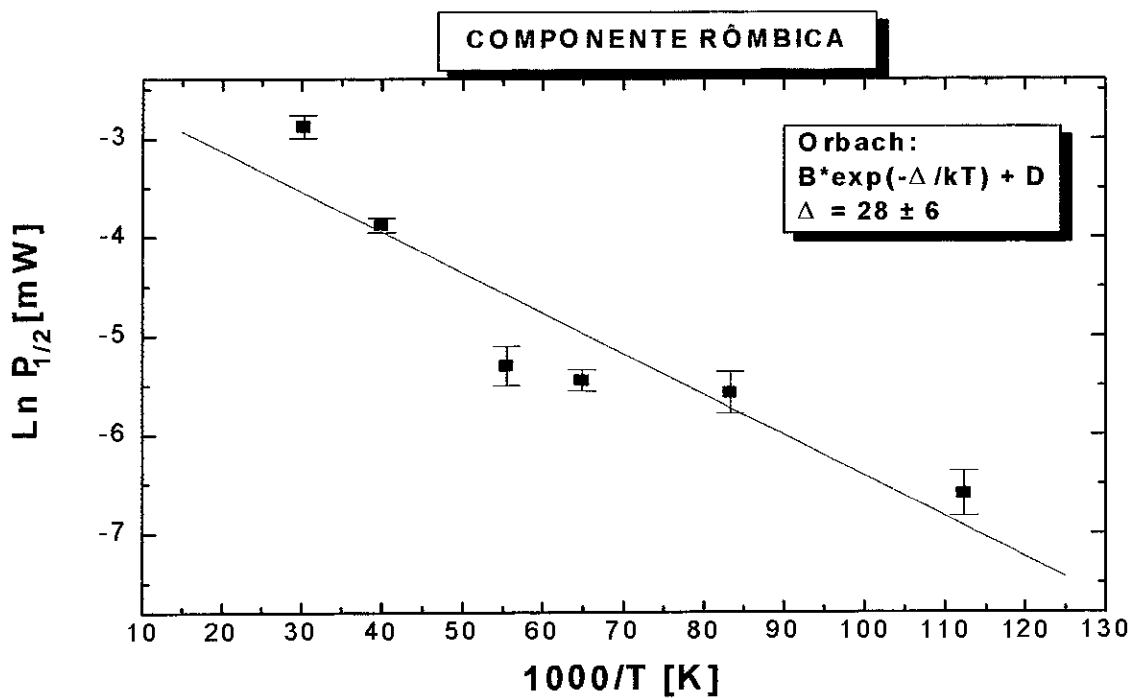


Figura 5.22.- Ajuste usando o modelo Orbach para g_{zz} da componente rômica.

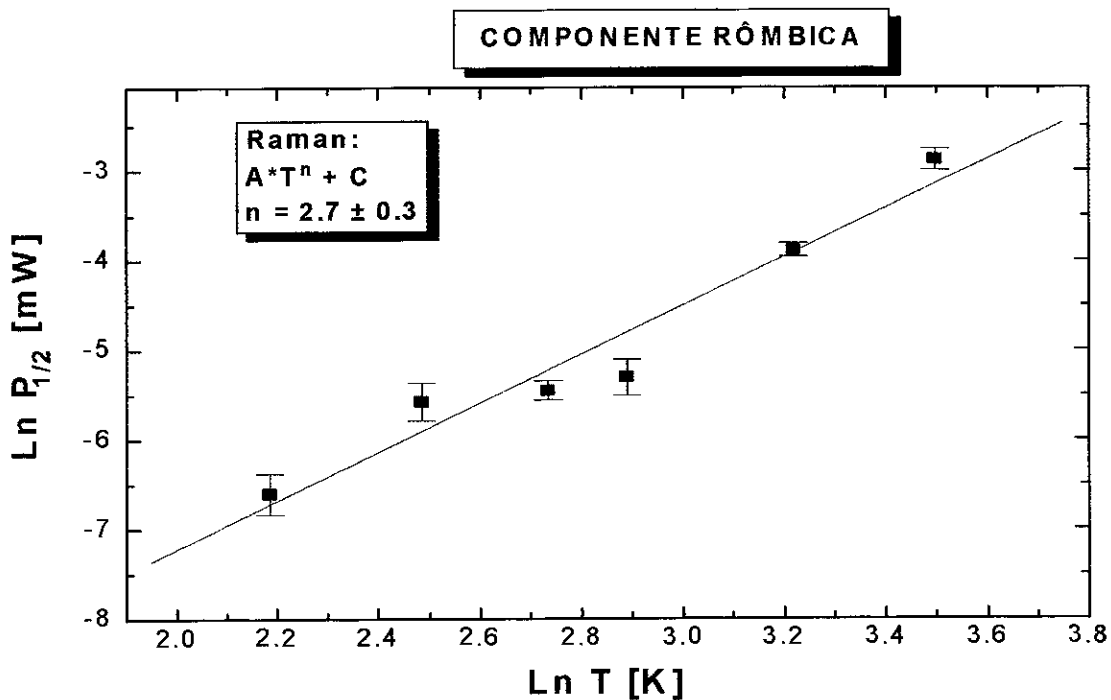


Figura 5.23.- Ajuste usando o modelo Raman para g_{zz} da componente rômica.

Para ambas componentes não é possível distinguir o melhor ajuste. Os valores de n para o modelo T^n , estão dentro da faixa esperada para o modelo de tunelamento entre dois estados localizados (TLS) como proposto por Nascimento et al ^[54] para MbNO; enquanto os valores de Δ encontrados para o modelo $\exp(-\Delta/T)$ podem ser correlacionados com o resultado de Wajnberg et al ^[34], que propôs que esta energia está relacionada à diferença entre duas geometrias diferentes do ligante da heme, em HbNO.

Capítulo 6.- Discussão e Conclusões

6.1.- Variação com a Temperatura

O comportamento com a temperatura dos espectros de EPR em banda Q, nas duas proteínas estudadas (HbNO e MbNO) é similar. Em ambos casos os espectros foram simulados como a soma de duas espécies puras, que podem ser associadas a duas diferentes estruturas estereoquímicas do N(histidina)-Fe-N(NO) com respeito ao plano da porfirina. Uma é representada por um espectro de EPR com simetria axial, com a direção da ligação coincidindo com o fator $g_{//}$, que é paralelo à normal do plano da porfirina. A outra apresenta um espectro de EPR com simetria rômbrica, onde a direção da ligação é inclinada em relação ao plano da porfirina^[35] (ver figuras 6.1 e 6.2).

Do mesmo jeito para ambas proteínas acontece uma mudança notável na forma da componente axial a baixa temperatura, só que no caso de HbNO é em torno de 85 ± 15 K e no caso de MbNO é em torno de 50 ± 10 K. Resultado similar foi observado por Wajnberg et al^[34] para medidas de HbNO em banda X, em torno de 32K. Duas possibilidades foram introduzidas: a primeira é que uma das componentes diminui sua intensidade devido à

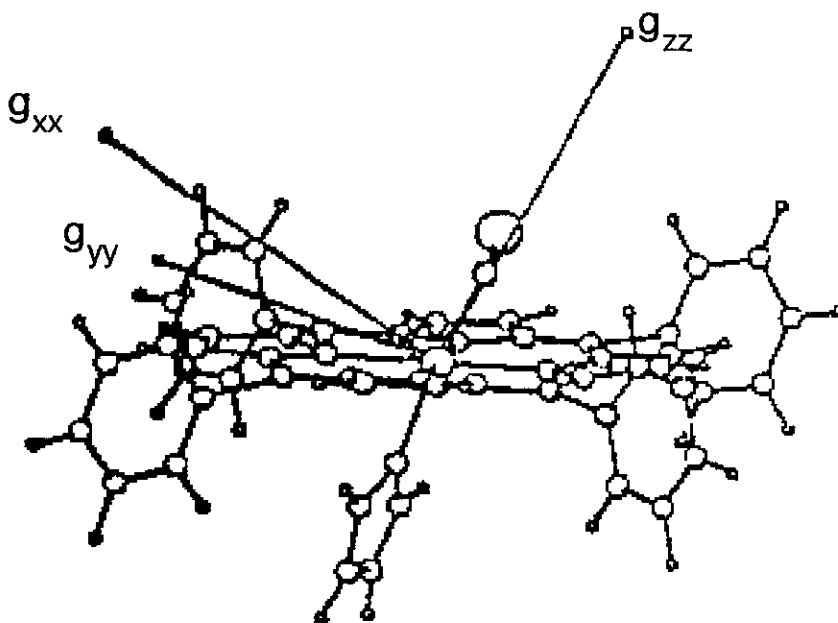


Figura 6.1.- Geometria e g-eixos da componente rômica de NO-Fe-N(histidina) ^[35].

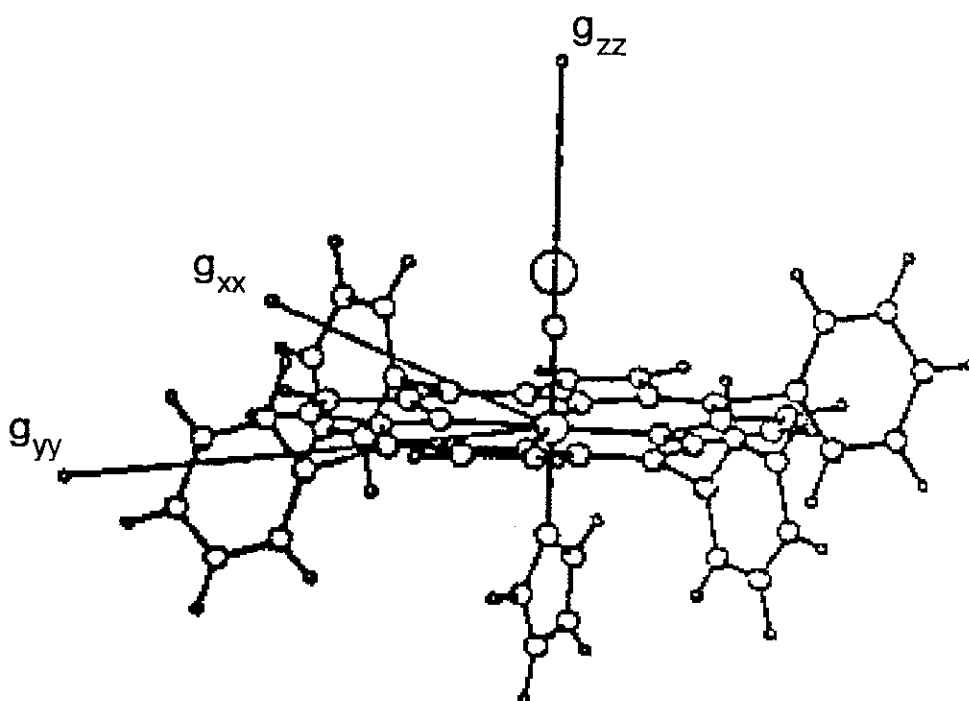


Figura 6.2.- Geometria e g-eixos da componente axial de NO-Fe-N(histidina) ^[35].

presença de outro centro paramagnético com relaxação muito mais rápida e a segunda possibilidade é que a espécie que diminui sua intensidade está mudando de uma espécie paramagnética para outra diamagnética.

Medidas do ângulo da ligação Fe-N-O com a normal foram obtidas para HbNO, variando de 150° a temperatura ambiente ^[60] (difração de raios X) para 110° a 77 K ^[5] (EPR). Em MbNO o ângulo é também ~110° em 77 K ^[61].

Morse e Chan ^[31] observaram duas componentes no espectro EPR-Banda X de solução de MbNO com valores de g semelhantes aos encontrados neste trabalho. Hori et al ^[32] também mostraram uma mudança no ângulo do ligante em torno de 77 K para MbNO, com EPR-Banda X em cristais.

Tabela 6.1.- Diversos valores dos fatores g para diversos autores.

Autor	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	g_{\perp}	g_{\parallel}	T (K)	Proteína	Componentes
Chien	2.082	1.991	2.025	-	-	78	Hb	1
Nascimento	2.078	1.982	2.006	-	-	103	Hb ¹	1
Nascimento	-	-	-	2.046	1.992	309	Hb ¹	1
Wajnberg	2.070	1.980	2.009	2.038	1.991	7.5	Hb	2
Este trabalho	2.075	1.975	2.005	2.028	1.999	19	Hb	2
Este trabalho	2.062	1.989	2.010	2.032	1.987	200	Hb	2
Chien	2.073	1.985	2.007	-	-	77	Mb	1
Morse	2.080	1.979	1.998	-	-	31	Mb	1
Morse	-	-	-	2.041	1.983	157	Mb	1
Hori	2.076	1.979	2.002	-	-	77	Mb	1
Hori	2.050	2.022	1.993	-	-	T.A.	Mb	1
Nascimento	2.087	1.983	2.008	-	-	113	Mb ²	1
Este trabalho	2.076	1.982	2.005	2.028	1.969	19	Mb	2
Este trabalho	2.062	1.989	2.010	2.034	1.990	200	Mb	2
Morse	2.072	1.970	2.003	-	-	43	Im-Hem-NO	1
Morse	-	-	-	2.038	1.988	185	Im-Hem-NO	1
Hüttermann	2.079	1.972	2.004	2.024	1.989	150	NO-TPP-Im	2

¹ Hemoglobina Annelidae *Glossoscolex paulistus* (Ec AGp).

² Mioglobina *Aplysia brasiliiana* (Mb Apb).

Nascimento et al ^[33] encontraram que os espectros de (Ec AGp) são formados por duas componentes, uma rômica que predomina a 103 K e outra axial que predomina em 309 K. No entanto, encontraram que os espectros de Mb Apb apresentam somente a componente rômica.

Hüttermann ^[35] estudou os espectros EPR em banda Q de derivados Im-TPP-NO em solução, e encontrou duas espécies numa faixa de temperatura entre 150 K e 215 K, com fatores g semelhantes aos nossos.

Na tabela 6.1 são apresentados os fatores g de uma série de experimentos realizados por outros autores, em diversas proteínas, a diferentes temperaturas e com o número de espécies encontradas para ser comparados com nossos resultados. Vemos que nossos valores obtidos estão dentro da faixa destes autores.

Henry e Banerjee ^[25] sugeriram que as duas componentes (rômica e axial) estão associadas com as cadeias polipeptídicas α e β . No entanto nossos resultados em MbNO e os de outros autores (Morse and Chan) sugerem que podemos associar estas componentes a diferentes estruturas da heme, já que a molécula de mioglobina é um monômero com só uma cadeia.

A análise do comportamento com a temperatura para as duas proteínas estudadas neste trabalho, pode ser feita estudando as frações das componentes no sinal EPR em função da temperatura. Assumindo a existência

de duas espécies conformacionais (rômbica e axial) em equilíbrio termodinâmico, é possível obter a fração relativa destas espécies (F_1/F_2) em função da temperatura. O modelo considera dois estados com energias livres ΔG_1 e ΔG_2 :

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{e^{-\Delta G_1/kT}}{e^{-\Delta G_2/kT}} = e^{-\Delta G/kT} \quad (35)$$

onde ΔG é a diferença de energia livre entre os dois estados com $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, considerando que ΔH e ΔS são independentes da temperatura. Na figura 6.3 mostramos o Ln deste parâmetro experimental, em função da inversa da temperatura. O desvio do comportamento linear para temperaturas acima de aproximadamente 100 K, mostra a presença de mais de dois estados conformacionais, como já observado da variação dos valores de g.

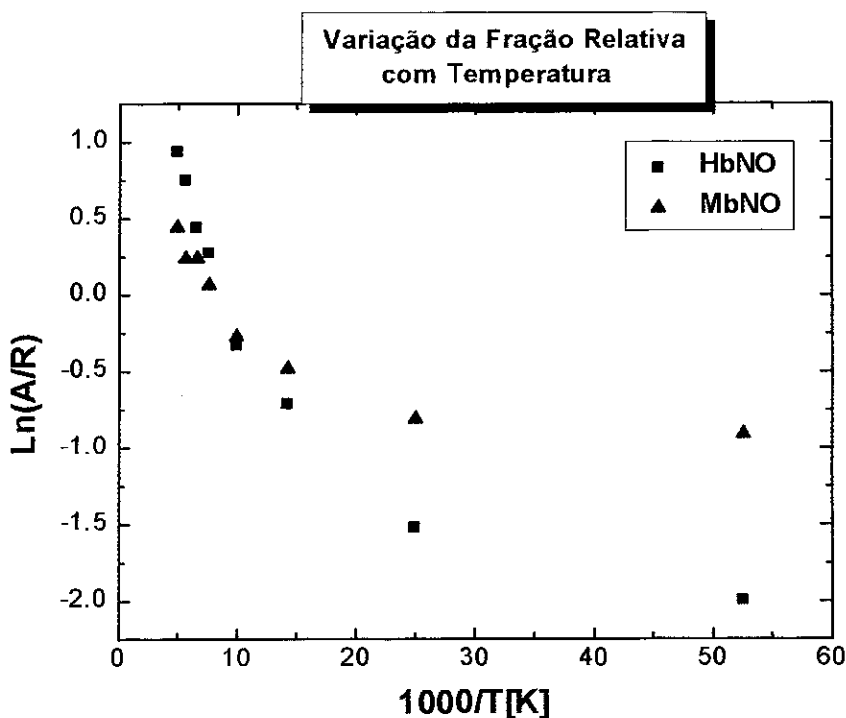


Figura 6.3.- Fração relativa Axial/Rômbica de HbNO e MbNO em função da temperatura, potência 0.9 mW.

Para verificar a importância do efeito de saturação, estudou-se o comportamento com a temperatura a uma potência mais baixa (0.003 mW), e encontrou-se o mesmo comportamento (ver figura 6.4).

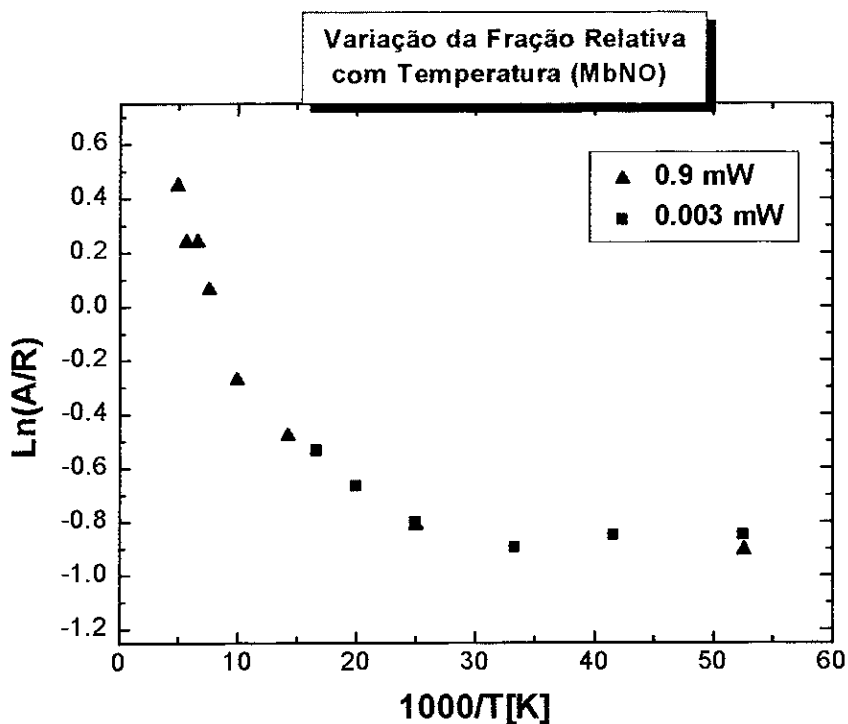


Figura 6.4.- Gráfico que mostra o mesmo comportamento da fração relativa com a temperatura, para 0.003 mW

Portanto, para poder explicar o comportamento das duas proteínas em estudo, introduzimos o modelo molecular chamado **modelo mínimo**, proposto por Ansari ^[62] para a mioglobina. Este modelo considera todas as características da cinética de dissociação do CO da mioglobina para determinar as conformações da mesma e, para cada conformação, dois estados geminados (ver figura 6.5) Mb e Mb*.

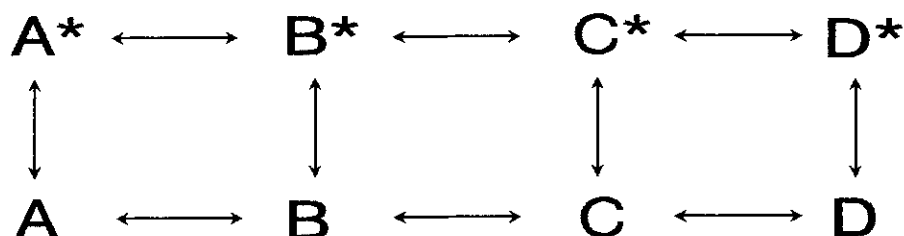
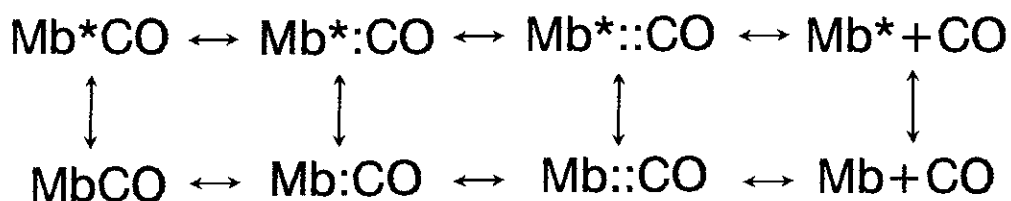


Figura 6.5.- Diagrama que representa os estados conformacionais da Mb com seus respectivos estados geminados ^[62].

Este modelo é correlacionado com o proposto por Frauenfelder e colaboradores, com a notação A, B, C e D acima. A se refere ao estado com CO ligado, B ao estado com CO no bolso da heme, C a um estado com CO dentro da proteína, mas fora do bolso e D ao estado com CO no solvente. Neste modelo, Mb* e Mb tem distintos espectros de absorção infravermelho para a deoxi-heme, os quais são independentes da posição do ligante na molécula. Mb* é considerada como a espécie de ligação rápida e Mb como a espécie de ligação lenta; portanto, a taxa de transição entre B* → A* é necessariamente maior que a taxa entre B → A. A idéia básica deste modelo é que, no mínimo, parte das mudanças espectrais são originadas pela transição da conformação de ligação rápida Mb* para a conformação de ligação lenta Mb. O modelo não exige que as conformações da proteína com ou sem ligante

sejam idênticas, mas implica que alguma mudança conformacional entre A* e B*, ou entre A e B, seja muito mais rápida que a taxa de ligação-dissociação.

Diferentes conformações tem sido deduzidas de medidas em espectroscopia infravermelha de Carboxi Mioglobina (MbCO). Três picos de absorção diferentes têm sido associados com três diferentes ângulos de CO em relação ao plano da heme^[63].

Vários experimentos discutem as conformações de Mb e Hb. As interpretações se baseiam principalmente na existência de duas conformações: axial e rômica (Morse, Nascimento, Wajnberg, Hüttermann). Esta série de experimentos mostra a existência de varias conformações adicionais na região de temperatura aqui investigada.

Observamos dois tipos de mudanças. A primeira está descrita pelo equilíbrio entre as conformações axial e rômica, descrita anteriormente em menos detalhe por Morse, Hori, Nascimento e Wajnberg. Mostramos que a fração com simetria rômica, predominante em baixas temperaturas, é maior em HbNO que em MbNO (ver figura 6.6). A 200 K, o limite de altas temperaturas investigadas, a HbNO contém menor fração de moléculas rômicas que a MbNO.

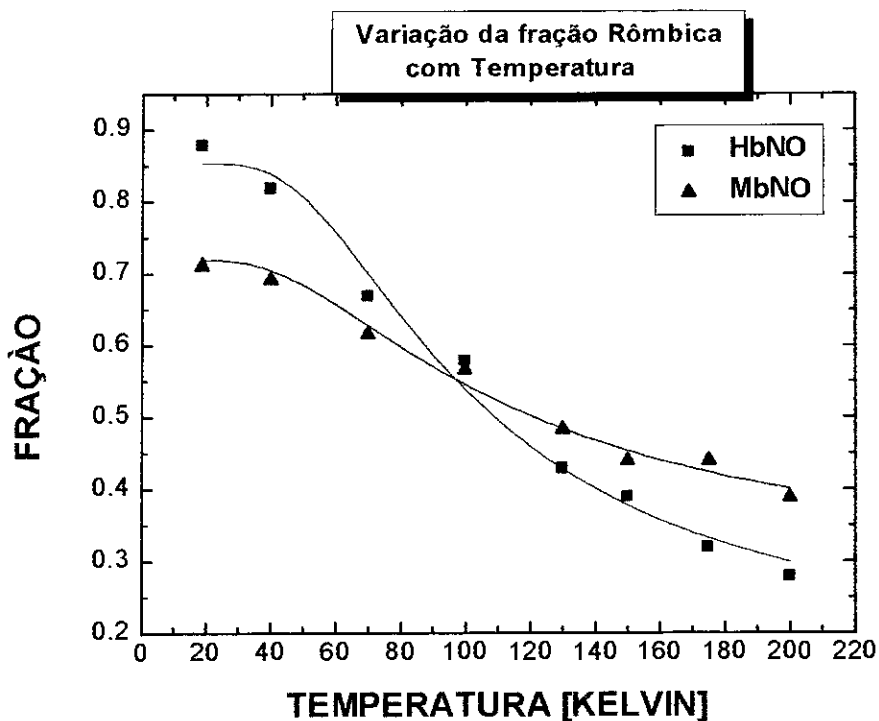


Figura 6.6.- Fração da espécie rômica em função da temperatura, potência 0.9 mW.

O segundo tipo de mudanças é mais sutil. A figura 6.3 nos indica a presença de maior número de estados conformacionais que simplesmente rômico e axial. A figura 6.7 mostra a variação de rombicidade nas moléculas rômicas em função da temperatura, indicada pela diferença dos valores g_{xx} e g_{yy} . Esta variação é mais pronunciada em HbNO que em MbNO. Os resultados experimentais nos sugerem que existem estados intermediários com $g_{xx}-g_{yy}$ constante em certas faixas de temperatura, o que está relacionado com o ângulo de NO com respeito à heme.

A diminuição de rombicidade indica aproximação à simetria axial.

No limite axial $g_{xx} = g_{yy}$.

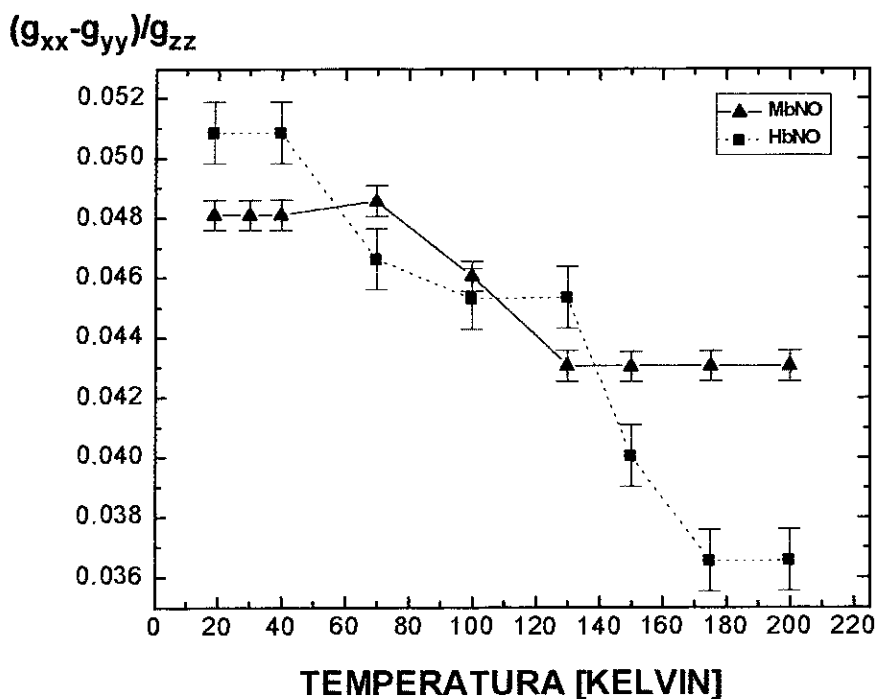


Figura 6.7.- Porcentagem de rombicidade da componente rômica de HbNO e MbNO.

Também as moléculas de simetria axial, mudam de comportamento, indicado pelo valor $g_{//}$ em HbNO e em MbNO (a ~85K e a ~50K respectivamente). Estas variações, menores se comparadas com transições rômica ↔ axial, se devem provavelmente ao aumento da distância entre Fe e o nitrogênio da histidina próxima (F8), com a variação de temperatura encontrada por Cupane et al ^[64] para desoxi-Hb e desoxi-Mb.

Portanto, nossos resultados para as duas proteínas estudadas (Hb e Mb), podem ser correlacionados com o modelo de Ansari que postula à existência de dois tipos de molécula (Mb e Mb*) e de um equilíbrio entre elas, existindo, além disso, subestados para cada tipo de molécula.

Da figura 6.6 podemos concluir que, comparando a fração de rombicidade das componentes rômbricas da HbNO e MbNO, observamos que a espécie rômbrica da HbNO é bem mais flexível que da MbNO, já que atinge valores mais extremos nas frações, tanto em baixa como em alta temperatura.

A diferença das larguras de linha entre as espécies axiais da HbNO e da MbNO, maiores para HbNO (nosso resultado) pode ser correlacionada com o modelo proposto por Bizzarri e Cannistraro ^[65] para mioglobina férrica, que assume uma distribuição nos valores de g , devido a uma distribuição nos níveis de energia eletrônicos, associados à existência de subestados conformacionais, considerando-se que a molécula de Hb contém quatro hemes (duas cadeias α e duas cadeias β) e que os valores dos fatores g para cadeias separadas são bastante dispersos ^[35], podemos esperar uma maior distribuição nos valores de g e portanto a uma maior largura de linha como observado aqui. Estes subestados são associados à variação da distância do ferro em relação à heme ao longo da normal do plano da heme. Neste trabalho foi observada esta variação para ambas proteínas.

6.2.- Estudo da Relaxação Spin-Rede de MbNO

Todos os resultados de outros autores indicam até agora que as nitrosil hemoproteínas não apresentam um mecanismo de relaxação relacionado com a estrutura fractal da proteína.

Nós primeiramente encontramos que os espectros EPR em banda Q de MbNO, em função da temperatura, refletem a presença de dois tipos de moléculas, umas com simetria axial e outras com simetria rômica (Mb e Mb*). Também vimos que ambas as classes de moléculas apresentam pequenas variações dentro da mesma simetria, que podem ser correlacionadas a subestados conformacionais.

Observamos em baixas temperaturas (8.9K até 33K) que os espectros EPR em banda Q de MbNO mudam em função da potência da microonda (ver figura 6.8) para uma temperatura fixa. Nesta variação se nota a presença de duas espécies, uma rômica e outra axial. A rômica predomina em baixas potências e a axial em altas. Portanto, podemos associar estas variações a flutuações entre as moléculas Mb e Mb*, já que nesta faixa de temperatura a rômica é constante.

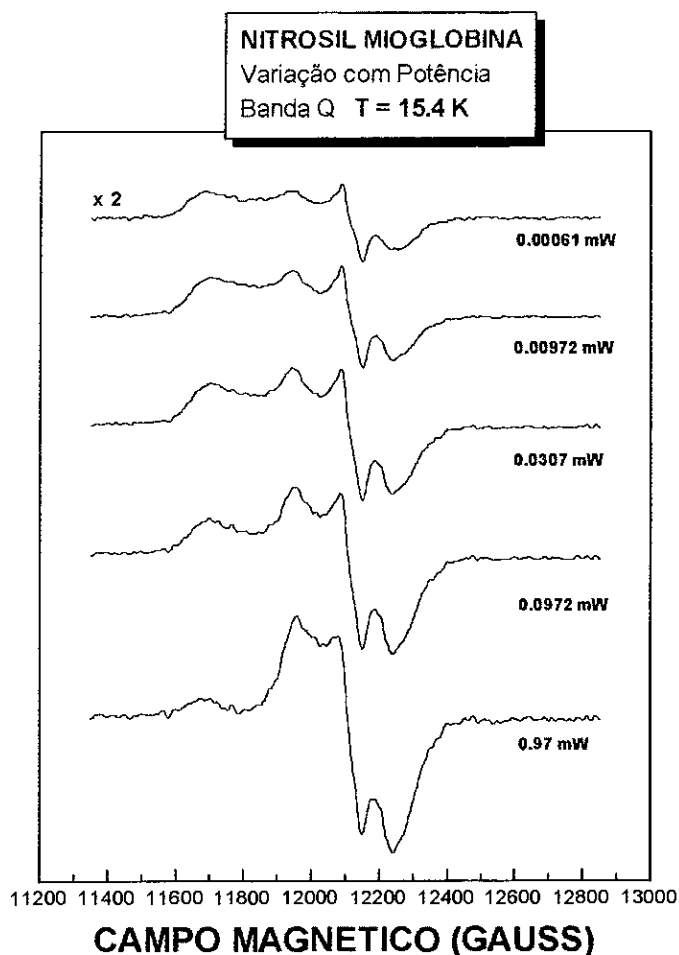


figura 6.8.- Espectros EPR em banda Q de MbNO em função da potência da microonda em 15.4 K

Tabela 6.2.- Parâmetros de ajuste para $1/T_1$, de acordo às equações 33 e 34.

Referencia	g	n	Δ (cm ⁻¹)	Proteína
34	2.009	-	28	HbNO
54	2.007	2.4	-	MbNO
54	2.064	2.4	-	MbNO ¹
54	2.003	2.1	-	MbNO ¹
Este trabalho	g_{\perp}	3.2	35	MbNO
Este trabalho	g_{zz}	2.7	28	MbNO

Nossos resultados de relaxação em ambas espécies (rômbica e axial), para os dois modelos, não nos permitem distinguir com qual dos dois

¹ Amostra em pó, o resto das amostras são em solução.

processos estão relaxando para a rede. Só podemos afirmar que em ambos os casos, com os valores obtidos para Δ e n , o processo de relaxação envolvido está relacionado com flutuações entre estados conformacionais em equilíbrio.

Para o modelo de tunelamento entre estados localizados, Nascimento et al ^[54] encontrou $n = 2.4$ (ver tabela 6.2) para MbNO em solução e pó, enquanto nós, encontramos $n = 2.7$ para a componente axial e $n = 3.2$ para a componente rômica. Neste modelo temos provavelmente tunelamento entre os níveis de energia dos estados das moléculas Mb e Mb* (rômica e axial).

Das equações (28) e (32) podemos estimar os valores de T_2 e T_1 , para 25 K obtendo 8.2×10^{-9} s e 6.8×10^{-2} s respectivamente, para g_{zz} (~ 2.007) da componente rômica. Dos dados de Nascimento et al ^[54] em banda-X, para MbNO em solução ($g = 2.007$) podemos estimar o valor de T_1 em 25 K, que dá 1.05×10^{-4} s. Alguns fatores podem contribuir para esta diferença nos valores de T_1 , a saber:

a) O tempo de relaxação para o modelo TLS é proporcional ao quadrado da frequência ^[55] que é responsável então pela diferença de uma ordem de grandeza (\sim fator 16).

b) A incerteza nos valores de Q e η para banda-Q (a bibliografia é escassa para banda-Q).

c) A diferença entre a origem das proteínas estudadas: Nossas medidas foram feitas em Mb de cavalo, enquanto Nascimento et al ^[54] em Mb de cachalote. Esta diferença também aparece na composição espectral. Enquanto Mb de cachalote apresenta uma componente, nós observamos duas para Mb de cavalo.

Wajnberg et al ^[34] encontraram para HbNO, o valor de $\Delta = 28 \text{ cm}^{-1}$ para o processo exponencial (ver tabela 6.2) para a componente **A**. A componente **A** pode ser considerada a componente rômica aqui estudada a baixa temperatura, para a qual obtemos $\Delta = 28 \text{ cm}^{-1}$. Da mesma forma podemos relacionar esta energia à diferença entre duas geometrias diferentes do ligante da heme (NO-Fe^{2+}) e ainda entre simetrias rômica e axial associadas às moléculas Mb e Mb* ^[62].

Os termos constantes C e D, predominantes a baixa temperatura, na faixa entre 9 K e 20 K, podem ser associados à relaxação cruzada, que é independente da temperatura, sugerida por Doetschman e Utterback ^[56] em cristais de HbNO, e que foi correlacionada a interação dipolar magnética entre hemes. Nossos resultados mostram que à interação pode ser entre duas hemes quaisquer, uma vez que o processo é também observado para Mb.

6.3.- Conclusões

- a) A variedade de resultados que mostram variação dos espectros (EPR, Raios-X) com a temperatura, pode ser associada a simetrias rômbrica e axial.
- b) Devido a nosso resultado para os espectros EPR em banda-Q de MbNO, não podemos associar as duas componentes (rômbrica e axial) com as cadeias polipeptídicas α e β , já que a molécula de mioglobina possui só uma cadeia.
- c) De acordo com o modelo mínimo proposto por Ansari, temos dois tipos de moléculas, para cada uma das hemoproteínas estudadas (Mb e Hb). Mb (Hb) e Mb* (Hb*) associadas às simetrias rômbrica e axial.
- d) Da curva da fração relativa (A/R) em função da temperatura podemos observar claramente que existem vários estados intermediários dentro das simetrias rômbrica e axial, já que se observa uma variação na diferença da entropia, ΔH , entre os dois tipos de moléculas. Estes estados podem ser associados com subestados conformacionais.
- e) Para as moléculas com simetria rômbrica, os estados observados caracterizados por ter $g_{xx} - g_{yy}$ constante em certas faixas de temperatura, podem ser correlacionados com diferentes ângulos de ligação do complexo Fe-NO com respeito ao plano da heme.

- f) Para as moléculas com simetria axial, os estados observados, caracterizados por variação nos valores de g_{\parallel} , podem ser correlacionados com aumento da distância entre o Fe e o N da histidina próxima (F8).
- g) Se observa uma maior largura de linha (maior distribuição dos valores de g) para a componente axial da HbNO que para a da MbNO, provavelmente por ter (a primeira) quatro cadeias polipeptídicas e por ter uma maior distribuição no deslocamento do ferro ao longo da normal do plano da heme.
- h) Observamos que os espectros EPR em banda-Q a baixa temperatura, dependem da potência da microonda, para uma temperatura fixa. Também se observa a presença de duas espécies, uma rômica e outra axial. Portanto, podemos associar esta dependência a flutuações entre as moléculas Mb e Mb*.
- i) O processo de relaxação spin-rede em MbNO não pode ser identificado. Só podemos afirmar que para os dois modelos utilizados ($e^{-\Delta T}$ e T^n) os resultados indicam, em ambos os casos e para as duas componentes, que o processo de relaxação envolvido está relacionado com flutuações entre estados conformacionais em equilíbrio.

Bibliografia

- [1] H. Frauenfelder, G. A. Petsko and D. Tsernoglou, *Nature*, (1979) 280, 558.
- [2] R. Dickerson & I. Geis, "*Hemoglobin*", *The Benjamin Cumming Publishing Company*, 1983.
- [3] M. D. Perutz, *Sci. Ame.*, 211 (1964) 5: 64-76.
- [4] J. Monod, J. Wyman and J. P. Changeaux, *J. Mol. Biol.*, (1965) 12: 88-118.
- [5] J. C. W. Chien, *J. Chem. Phys.*, (1969) 51: 4220-4227.
- [6] A. Ehrenberg & T. W. Szczepkowsky, *Acta Chem. Scand.*, (1960) 14: 1684-1692.
- [7] L. M. Neto, O. R. Nascimento, M. Tabak and I. Caracelli, *Biochim. Biophys. Acta*, (1988) 956: 189-196.
- [8] R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder and I. C. Gunsalus, *Biochem.*, 14 (1975) 5355.
- [9] F. Parak and Hans Frauenfelder, *Physica A*, (1993) 201: 332-345.
- [10] H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G. A. Petsko, D. Ringe Ponzi and H. Frauenfelder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (1982) 4967.
- [11] F. Parak, H. Hartmann, K. D. Aumann, H. Reuscher, G. Rennekamp, H. Bartunik and W. Steigemann, *Eur. Biophys. J.*, 15 (1987) 237.
- [12] F. Parak, E. N. Frolov, A. A. Kononenko, R. L. Mössbauer, V. I. Goldanskii and A. B. Rubin, *FEBS Lett.*, 117 (1980) 368.
- [13] F. Parak, P. Finck, D. Kucheida and R. L. Mössbauer, *Hyperfine Interactions*, 10 (1981) 1075.
- [14] V. I. Goldanskii, Y. F. Krupyanskii and V. N. Flerov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 272 (1983) 23.
- [15] G. P. Singh, H. J. Schink, H. V. Löhneysen, F. Parak and S. Hunklinger, *Z. Phys. B*, 55 (1984) 23.
- [16] A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, I. E. T. Iben, T. B. Sauke, E. Shyamsunder and R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 5000.

- [17] M. K. Hong, D. Braunstein, B. R. Cowen, H. Frauenfelder, I. E. T. Iben, J. R. Mourant, P. Ormos, R. Scholl, A. Schulte, P. J. Steinbach, A. H. Xie and R. D. Young, *Biophys. J.*, (1990) 58: 429-436.
- [18] C. P. Poole Jr., "*Electron Spin Resonance*", John Wiley & Sons, 1983.
- [19] G. Pake & T. L. Estle, "*The Physical Principles of Electron Paramagnetic Resonance*", W. A. Benjamin Inc., 1973.
- [20] P. F. Knowles, D. Marsh and H. W. E. Rattle, "*Magnetic Resonance of Biomolecules*", John Wiley & Sons Ltd., 1976.
- [21] G. Feher, "*Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology*", Gordon & Breach, New York, 1970.
- [22] D. O. Hearshen, W. R. Ducham, R. H. Sawds & H. J. Grande, "*In Electron Transport and Oxygen Utilization*", (C. Ho, ed), Elsevier, Amsterdam/New York, (1982), 395
- [23] C. More, P. Bertrand & J. P. Gayda, *Journal of Magnetic Resonance*, (1987) 73: 13-22.
- [24] M. A. Perutz, J. V. Kilmartin, K. Nagai, A. Szabo and S. R. Symon, *Biochemistry*, (1976) 15: 378-387.
- [25] Y. Henry and R. Banerjee, *J. Mol. Bio.*, (1973) 73: 469-482.
- [26] M. Chevion, J. M. Salhany, J. Peisach, W. E. Blumberg and S. Simon, *Biochemistry*, (1978) 17: 1745-1750.
- [27] A. Szabo and M. F. Perutz, *Biochemistry*, (1976) 15: 4427-4428.
- [28] P. Reisberg, J. S. Olson and G. Palmer, *J. Biol. Chem.*, 251 (1976) 14: 4379-4383.
- [29] M. Chevion, A. Stern, J. Peisach, C. L. Castillo and W. E. Blumberg, *Israel J. Chem.*, (1976) 15: 311-317.
- [30] L. M. Neto, *Tese de Doutorado*, (1988), IFQSC-USP, São Carlos, SP.
- [31] R. H. Morse & S. I. Chan, *J. Biol. Chem.*, (1980) 255:7876-7882.
- [32] H. Hori, M. Ikeda-Saito and T. Yonetani, *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(15), 7849-7855.
- [33] I. Caracelli, N. C. Meirelles, M. Tabak, O. B. Filho and O. R. Nascimento, B. B. A., (1988) 955: 315-320.

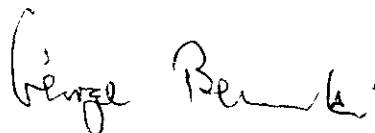
- [34] E. Wajnberg, M. P. Linhares, L. J. El-Jaick and G. Bemski, *European Biophysics Journal*, (1991) 21: 57-61.
- [35] J. Hüttermann, C. Burgard and R. Kappl, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1994, 90(20), 3077-3087.
- [36] E. Trittelvitz, K. Gersonde and K. H. Winterhalter, *Europ. J. Biochem.*, (1975) 51: 33-42.
- [37] D. C. Doetschman, S. A. Schwartz and S. G. Utterback, *Chem. Phys.*, (1980) 49: 1-8.
- [38] S. K. Mun, J. C. Chang & T. P. Das, *Proc. Natl. Acad. Sci. LISA*, (1979) 76: 4842-4846.
- [39] A. Waleh, N. Ho, L. Chantranupong and G. H. Loew, *J. Am. Chem. Soc.*, (1989) 111: 2767-2772.
- [40] P. Bonville, *Revue Phys. Appl.*, (1983) 18: 365-411.
- [41] R. Lenk, "*Brownian Motion and Spin Relaxation*", Elsevier Scientific Publishing Company, 1977.
- [42] C. P. Slichter, "*Principles of Magnetic Resonance*", Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- [43] J. H. Van Vleck, *Physical Review*, (1941) 59: 724-729.
- [44] P. J. Muench, T. R. Askew, J. T. Colvin and H. J. Stapleton, *J. Chem. Phys.*, (1984) 81:63-65.
- [45] A. R. Drews, B. D. Thayer, H. J. Stapleton, G. C. Wagner, G. Giugliarelli and S. Cannistraro, *Biophys. J.*, (1990) 57: 157-162.
- [46] J. P. Allen, J. T. Colvin, D. G. Stinson, C. P. Flynn and H. J. Stapleton, *Biophys. J.*, (1982) 38: 299-310.
- [47] H. J. Stapleton, J. P. Allen, C. P. Flynn, D. G. Stinson and S. R. Kurtz, *Physical Review Letters*, 45 (1980) 17: 1456-1459.
- [48] J. W. Culvahouse and P. R. Richards, *Phys. Rev.*, (1969) 178: 485-497.
- [49] C. P. Scholes, R. A. Isaacson and G. Feher, *Biochim. Biophys. Acta*, (1971) 244: 206-210.
- [50] G. C. Wagner, J. T. Colvin, J. P. Allen and H. J. Stapleton, *J. Ame. Chem. Soc.*, 107 (1985) 20, 5589.

- [51] J. S. Helman, A. Coniglio and C. Tsallis, *Phys. Rev. Lett.*, 53 (1984) 12, 1195.
- [52] E. Wajnberg, H. J. Kalinowski, G. Bemski and J. S. Helman, *Biophys. J.*, (1986) 49: 1195-1198.
- [53] P. J. Muench and H. J. Stapleton, *J. Chem. Phys.*, 82 (1985) 6, 2828.
- [54] O. R. Nascimento, L. M. Neto and E. Wajnberg, *J. Chem. Phys.*, 95 (1991) 4, 2265.
- [55] S. R. Kurtz and H. J. Stapleton, *Physical Review B*, 22 (1980) 5: 2195-2205.
- [56] D. C. Doetschman and S. G. Utterback, *J. Amer. Chem. Soc.*, 103 (1981) 2847.
- [57] J. R. W. Louro, P. C. Ribeiro e G. Bemski, *Biochim. Biophys. Acta*, 670 (1981) 56.
- [58] R. L. Belford and M. J. Nilges, "Computer Simulation of Powder Spectra", *EPR Symp.*, Colorado (august, 1979).
- [59] M. C. Figueiredo Lima e Lara, "Estudos das Interações do Ion Cu^{2+} com os Dipeptídeos Glicil-Triptofano e Triptofil-Glicina", Tese Doutorado, 1993, 29.
- [60] J. F. Deatherage, K. Moffat, *J. Mol. Biol.*, (1979) 134: 401-417.
- [61] L. C. Dickinson and J. C. W. Chien, *J. Amer. Chem. Soc.*, (1971) 193: 5036-5040.
- [62] A. Ansari, C. M. Jones, E. R. Henry, J. Hofrichter and W. A. Eaton, *Biochemistry*, (1994) 33: 5128-5145.
- [63] A. Ansari, J. Berendzen, D. Braunstein, B. R. Cowen, H. Frauenfelder, M. K. Hong, I. E. T. Iben, J. B. Johnson, P. Ormos, T. B. Sauke, R. Scholl, A. Schulte, P. J. Steinbach, J. Vittitow and R. D. Young, *Biophysical Chemistry*, (1987) 26: 337-355.
- [64] A. Cupane, M. Leone, E. Vitrano, *Eur. Biophys J.*, (1993) 21: 385-391.
- [65] A. R. Bizarri and S. Cannistraro, *Eur. Biophys. J.*, (1993) 22: 259-267.

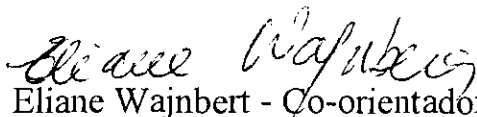
**"NITROSIL HEMOPROTEÍNAS: UM ESTUDO
POR EPR EM BANDA Q"**

Marco Antonio Flores Rivera

Tese de Mestrado apresentada no Cen-
Brasileiro de Pesquisas Físicas, do Con-
selho Nacional de Desenvolvimento Ci-
entífico e Tecnológico, fazendo parte da
Banca Examinadora os seguintes profes-
sores:



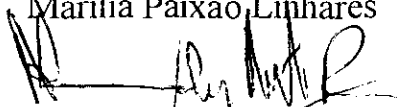
George Bemski - Presidente



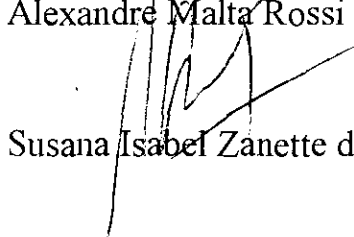
Eliane Wajnbert - Co-orientador



Marília Paixão Linhares



Alexandre Malta Rossi



Susana Isabel Zanette de Caride - Suplente

Rio de Janeiro, 29 de março de 1996