

OSMAR CAÔN FILHO

CONTRIBUIÇÃO DA SOLVATAÇÃO À ENTALPIA E
ENTROPIA DE OXIGENAÇÃO DE HEMOGLOBINA
HUMANA.



1910001322



OSMAR CAÔN FILHO

**CONTRIBUIÇÃO DA SOLVATAÇÃO À ENTALPIA E
ENTROPIA DE OXIGENAÇÃO DE HEMOGLOBINA
HUMANA.**



T. 1322/05

Tese apresentada ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular

Orientador: Prof. Dr. *Marcio Francisco Colombo*

São José do Rio Preto - SP
2003

577.31

C235c

20901003

13/01/2005

Doação

R\$ 30,00

Autor(a)

076/2005

OSMAR CAÔN FILHO

Caôn Filho, Osmar.

Contribuição da solvatação à entalpia e entropia de oxigenação de hemoglobina humana / Osmar Caôn Filho – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003

164 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio Francisco Colombo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobina. 2. Entalpia. 3. Entropia. 4. Hemoglobina - Hidratação. I. Colombo, Marcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3



Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.



AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho

É com carinho muito especial que agradeço ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo, pela orientação, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção e cujo exemplo de postura científica me estimula a seguir a caminho que agora percorro.

Ao Prof. Dr. Jorge Chahine, coordenador do curso de pós-graduação, pela atenciosa acolhida e incentivo constante no decorrer de minha permanência no de departamento.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto e Prof. Dr. Marcio José Tiera pela colaboração preziosa na análise deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física, Prof. Dr. Marcelo Anders Fouzey Prof. Dr. Jonny Hizzieri, Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio, Prof. Dr. Elton Drigo Filho, Prof. Dr. José Ramon Abrego, Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto, Prof. Dr. Elai Feinza, Prof. Dr. Raguier Arai, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Aos técnicos do departamento de Física e amigos Paulinho e Tulinho Barbosa, cujo convívio e auxílio que foram de fundamental importância na confecção, polimento e implementação da cela exstropolarimétrica.

Aos queridos amigos e afilhados Deimar e Gláucia, que durante inúmeras horas me ensinaram e mostraram que mesmo a partir de momentos adversos é possível sair com uma linda história de AMOR.

Aos meus estimados companheiros de laboratório, Flávia, Bernadete, Tatiana, Priscilla, Sandra, Renato, Alexandre "Mac" e Andrea, pela amizade e gentileza compartilhada com que amadureceram juntos cientificamente pelo carinho e incentivos constantes.

A minha esposa, **Maruza Iara Cristiano Caôn**, cujo amor, companheirismo, incentivo, confiança e apoio foram essências e de extrema importância.

Agradeço também a Ilya, secretária do departamento de Física, por sua excepcional cooperação.

AGRADECIMENTOS

É com carinho muito especial que agradeço ao **Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo**, pela orientação, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção e cujo exemplo de postura científica me estimulou a seguir a caminho que agora percorro.

Ao **Prof. Dr. Jorge Chahine**, coordenador do curso de pós-graduação, pela afetuosa amizade e incentivo constante no decorrer de minha permanência neste departamento.

Ao **Prof. Dr. João Ruggiero Neto** e **Prof. Dr. Marcio José Tiera** pela colaboração prestativa na análise deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física, **Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey**, **Prof. Dr. Jonny Rizzieri**, **Pro. Dr. Marinônio Lopes Cornélio**, **Prof. Dr. Elso Drigo Filho**, **Prof. Dr. José Ramon Abrego**, **Prof. Dr. José Roberto Ruggiero**, **Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto**, **Prof. Dr. Eloi Feitosa**, **Prof. Dr. Raguver Arni**, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Aos técnicos do departamento de Física e amigos, **Paulinho** e **Toninho Barbosa**, cujo convívio e auxílio que foram de fundamental importância na confecção, polimento e implementação da cela espectropolarimétrica.

Aos queridos amigos e afilhados **Ocimar** e **Gláucia**, que dentre inúmeras lições me ensinaram e mostraram que mesmo a partir de momentos adversos é possível sim, construir uma linda estória de AMOR.

Aos meus estimados companheiros de laboratório: **Flavio**, **Bernadete**, **Fátima**, **Priscilla**, **Sandra**, **Renato**, **Alexandre "Mac"** e **Andres**, pela amizade e gostosa cumplicidade com que amadurecemos juntos cientificamente, pelo carinho e incentivos constantes.

A **Luis Paulo**, **Fernanda**, **Fábio**, **Hamilton**, **Giovani**, **Cecília**, **Norma**, **Sabrina**, **Tereza**, **Raquel**, **Milton**, **Benatti** e **Leandra** por cultivarem um ambiente propício ao trabalho.

Agradeço também a **Ilva**, secretária do departamento de Física, por sua excepcional cooperação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, **Nanci, Oscar, Rosemar**, pelo auxílio em todos os momentos.

Aos demais e não menos importantes colegas do curso de pós-graduação pelo ambiente de trabalho saudável e pela convivência harmoniosa.

A meus pais, **Osmar e Leticia**, que sempre acreditaram em mim e aos meus irmãos **Rogério, Gustavo e Giovana**, que me incentivaram.

A meu sogro **Antônio** e minha sogra **Maria Aparecida**, pela confiança e pelo incentivo no decorrer deste trabalho.

Isadora, minha filha ...

*Queridas uninhas róseas ... bocas de úmida, fresca avidez,
de onde todas as notas, loucas, querem fugir de uma só vez...
Olhinhos de água tão pura que nada há que os espante...
Sensível narina aflante...Inquieta mão que procura...
Indeciso quadril, mas já com aquele fêmineo encanto...
Sobrancelhinhas: um veludo... Orelhas, dedinhos... Ah,
nem queiras saber tudo quanto elas prometem à vida...*

Mário Quintana
(1906 – 1994)

Ao **CNPq** pelo suporte financeiro.

A Deus, pela vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
Resumo	15
Abstract	17
1 - INTRODUÇÃO	19
1.1 - Hemoglobina	20
1.2 - A ligação cooperativa de O_2	21
1.3 - Regulação alostérica	25
1.3.1 - Efeito do pH	26
1.3.2 - Efeito do Cl^- e de outros íons	28
1.3.3 - A existência de estados intermédios da Hb durante sua oxigenação	30
1.3.4 - Efeito da temperatura	31
2 - OBJETIVOS	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 - Purificação de hemoglobina	37
3.1.1 - Montagem da coluna de cromatografia	37
3.1.2 - Eluição da amostra	38
3.2 - Determinação da concentração proteica	40
3.3 - Determinação do pH de solução	41
3.4 - Medidas de estabilidade	38
3.5 - Determinação da curva de oxigenação da Hb pelo método de Hill	42
3.6 - Descrição da célula espectrofotométrica	44
3.7 - Determinação de pO ₂ por polarografia	46
3.7.1 - O funcionamento da célula de oxigênio	46
3.7.2 - Calibração elétrica do instrumento	48
3.7.3 - Calibração do oxímeter com 2 hemoglobinas	50
3.8 - Determinação da saturação fracional por espectrofotometria	52
3.9 - Determinação dos dados da curva de equilíbrio de Hill	56
3.9.1 - O gráfico de Hill	56
3.10 - Comparação entre P ₅₀ e 2 unidades médias do ligante	58
3.11 - Exemplos de gráficos	60

“A imaginação é mais importante que o conhecimento.”

Albert Einstein
(1879-1955)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.	9
LISTA DE TABELAS.	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.	14
Resumo.	15
Abstract.	17
1 - INTRODUÇÃO.	19
1.1 - Hemoglobina.	20
1.2 - A ligação cooperativa do O ₂ .	21
1.3 - Regulação alostérica.	25
1.3.1 - Efeito de água.	26
1.3.2 - Efeito do íon cloreto.	28
1.3.3 - A existência de estados intermediários da Hb durante sua oxigenação.	30
1.3.4 - Efeito da temperatura.	31
2 - OBJETIVOS.	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.	36
3.1 - Purificação da hemoglobina.	37
3.1.1 - Montagem da coluna de cromatografia	37
3.1.2 - Eluição da amostra	38
3.2 - Determinação da concentração protéica.	40
3.3 - Determinação do pH da solução.	42
3.4 - Medidas de osmolalidades.	38
3.5 - Determinação de curvas de oxigenação da Hb pelo método de Imai.	42
3.6 - Descrição da cela espectropolarimétrica.	44
3.7 - Determinação da pO ₂ por polarimetria.	46
3.7.1 - O funcionamento do eletrodo de oxigênio.	46
3.7.2 - Calibração estática do oxímetro.	48
3.7.3 - Calibração do oxímetro com a temperatura.	50
3.8 - Determinação da saturação fracional por espectrofotometria.	50
3.9 - Determinação dinâmica da curva de equilíbrio de oxigenação.	52
3.9.1 - O gráfico de Hill.	56
3.10 - Comparação entre P ₅₀ e a atividade média do ligante (Pm).	58
3.11 - Equações de linkage.	60



3.12 – Equação de van't Hoff.	64
4 - RESULTADOS.	66
4.1 - Efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb por O ₂ .	67
4.2 - Efeito da atividade de água sobre a constante de associação do primeiro O ₂ à Hb (K ₁).	70
4.3 - Efeito da temperatura sobre $\Delta n_{w(P50)}$ $\Delta n_{w(K1)}$.	71
4.4 - Comportamento do calor de oxigenação total (ΔH_{P50}) e da ligação da primeira molécula de O ₂ (ΔH_{K1}) em função de a_w .	75
4.5 - Influência da concentração de NaCl sobre o Δn_w .	82
4.6 – Determinação da ΔH e ΔS de van't Hoff em diferentes [NaCl] .	87
4.7 - Dependência do ΔH de oxigenação total e da ligação da primeira molécula de O ₂ em função da concentração do íon cloreto.	92
4.8 - Dependência do ΔS de oxigenação total e da ligação da primeira molécula de O ₂ em função da concentração do íon cloreto.	94
4.9 - Relação entre ΔH^{Obs} , ΔS^{Obs} e Δn_w^{Obs} obtidos em função da [NaCl].	100
4.10 - O fenômeno de compensação entalpia - entropia de oxigenação.	103
4.11 – Dependência do Δn_w e ΔH_i em pH 9,0.	110
4.11.1 – Comportamento do Δn_w em pH 9,0.	110
4.11.2 – Comportamento do ΔH_i em pH 9,0.	114
5 - DISCUSSÃO.	119
5.1 - Efeito da atividade de água P ₅₀ e K ₁ .	120
5.2 - Efeito da temperatura sobre $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$.	122
5.3 - Influência da [Cl ⁻] nos valores de Δn_w de oxigenação.	124
5.4 - Influência da [Cl ⁻] na entalpia de oxigenação.	126
5.5 - Correlação entre Δn_w , ΔH e ΔS de oxigenação.	128
5.6 – Relação entre os valores de entalpia e entropia de hidratação determinados neste trabalho com outros da literatura.	132
6 - CONCLUSÕES.	137
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.	140
7.1 – Bibliografia consultada.	148
7.2 – Participações em congressos.	151
Anexos.	152
Anexo A - Efeito da temperatura no ΔC_p de oxigenação da Hb.	153
Anexo B - Tabelas com valores de entalpia e entropia de hidratação.	158
Glossário.	163



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hemoglobina humana (Hb A ₀).	20
Figura 2: Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida.	39
Figura 3: Esboço da cela utilizada nos experimentos.	44
Figura 4: Equipamentos utilizados pelo método de oxigenação automático.	45
Figura 5: Circuito utilizado para polarizar o eletrodo.	47
Figura 6: Curva de calibração do oxímetro.	49
Figura 7: Espectros de absorção da desoxi-Hb da oxi-Hb, na região do visível.	51
Figura 8: Curva de equilíbrio de oxigenação (OEC) da hemoglobina A ₀ .	53
Figura 9: Extrapolação para determinar A _{oxi} .	55
Figura 10: Extrapolação para determinar A _{desoxi} .	56
Figura 11: Gráfico de Hill exemplificando a determinação de P ₅₀ e n ₅₀ .	57
Figura 12: Curva de desoxigenação da Hb A ₀ . Determinação de P _m .	60
Figura 13: Comportamento da afinidade da Hb A ₀ por O ₂ em diferentes a _w .	67
Figura 14: Gráfico de ln P ₅₀ versus ln a _w .	69
Figura 15: Gráfico de ln K ₁ versus ln a _w .	71
Figura 16: Gráfico de ln P ₅₀ versus ln a _w em cinco temperaturas.	72
Figura 17: Gráfico de ln K ₁ versus ln a _w em cinco temperaturas.	73
Figura 18: Variações de hidratação associadas à oxigenação total e à K ₁ .	74
Figura 19: O Gráfico de van't Hoff para P ₅₀	75
Figura 20: O Gráfico de van't Hoff para K ₁ .	76
Figura 21: Variações de entalpia associadas à oxigenação total e à K ₁ .	78
Figura 22: Dependência de ΔH _(P50) e ΔH _(K1) contra atividade de água.	79
Figura 23(a): Comportamento de ΔG _(P50) em diferentes a _w .	80
Figura 23(b): Comportamento de ΔG _(K1) em diferentes a _w .	80
Figura 24: Gráfico de P ₅₀ em função de a _w , realizado em cinco concentrações distintas de NaCl.	82

Figura 25: Gráfico de K_1 em função de a_w , realizado em cinco concentrações distintas de NaCl.	83
Figura 26: Dependência de $\Delta n_{w(P50)}$ e de $\Delta n_{w(K1)}$ com a concentração molar de NaCl.	85
Figura 27: Esquema que representa a dependência de Δn_w com a concentração molar de NaCl.	86
Figura 28: O Gráfico de van't Hoff, para P_{50} medidos em diferentes concentrações de ânions.	88
Figura 29: Gráfico de van't Hoff para K_1 , medidos em diferentes concentrações de ânions.	90
Figura 30: Dependência da mudança da variação de entalpia de oxigenação da Hb contra a concentração molar de NaCl.	93
Figura 31: Dependência da mudança da variação de entropia de oxigenação da Hb humana contra a concentração molar de NaCl.	95
Figura 32: Variações de entalpia, entropia e energia livre associadas com as Variações conformacionais da hemoglobina.	97
Figura 33: Gráfico de ΔH e $T\Delta S$ de oxigenação total em função de Δn_w .	100
Figura 34: Gráfico de ΔH e $T\Delta S$, medidos em K_1 , em função de Δn_w .	102
Figura 35: Gráfico de Compensação para oxigenação total da Hb.	104
Fig. 36 (a): Comparação entre o fenômeno de compensação de oxigenação total da Hb com a hidratação de resíduos hidrofóbicos.	105
Fig. 36(b): Comparação entre o fenômeno de compensação de oxigenação total da Hb com a hidratação de resíduos hidrofílicos.	106
Figura 37: Gráfico de Compensação, $\Delta H_{(K1)} \times \Delta S_{(K1)}$, para a K_1 .	107
Fig. 38(a): Comparação entre o fenômeno de compensação de ligação do primeiro oxigênio Hb com a hidratação de resíduos hidrofóbicos.	108
Fig. 38(b): Comparação entre o fenômeno de compensação de ligação do primeiro oxigênio Hb com a hidratação de resíduos hidrofílicos.	109
Figura 39: Gráfico de $\ln P_{50}$ em função de a_w observado em pH 7,3 e 9,0.	111
Figura 40: Gráfico de $\ln K_1$ em função de a_w observado em pH 7,3 e 9,0.	111
Figura 41: Comparação entre a dependência de $\Delta n_{w(pH7,3)}$ e $\Delta n_{w(pH9,0)}$ contra a concentração molar de NaCl.	113
Figura 42: Comparação entre os gráficos de van't Hoff, obtidos em pH 7,3 e 9,0.	114



Figura 43: Comparação entre os gráficos de van't Hoff, obtidos para K_1 em pH 7,3 e 9,0.	115
Figura 44: Comparação da dependência de ΔH em função de concentração molar de NaCl, determinadas em pH 7,3 e pH 9,0.	117
Figura 45: Comparação da dependência de ΔH em função de concentração molar de NaCl, determinadas em pH 7,3 e 9,0.	118
Figura 46: Comparação da dependência de ΔH em função de concentração molar de NaCl, determinadas a partir do gráfico de $\ln P_{50}$ versus $1/T$ e da equação integrada de van't Hoff.	155
Figura 47: Comparação da dependência de ΔH em função de concentração molar de NaCl, determinadas a partir do gráfico de $\ln K_1$ versus $1/T$ e da equação integrada de van't Hoff.	157

LISTA DE TABELAS.

Tabela 1: Valores experimentais dos coeficientes de extinção molar da oxi-Hb e meta-Hb.	41
Tabela 2 Valores experimentais referentes a calibração do oxímetro.	49
Tabela 3: Dependência da afinidade da Hb com a a_w .	68
Tabela 4: Dependência de $\ln K_1$ com a atividade de água.	70
Tabela 5: Comportamento de $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ em diferentes temperaturas.	74
Tabela 6: Comportamento de $\Delta H_{(P50)}$ e $\Delta H_{(K1)}$ em diferentes a_w .	77
Tabela 7: Comportamento do $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ em diferentes [NaCl].	84
Tabela 8: Valores de $\Delta n_{w(P50)}$, $\ln P_{50}$, $\Delta G_{(P50)}$, $\Delta S_{(P50)}$, $\Delta H_{(P50)}$ e das extrapolações dos ajustes lineares dos gráficos de van't Hoff obtidos em diferentes [NaCl].	89
Tabela 9: Valores de $\Delta n_{w(K1)}$, $\ln K_1$, $\Delta G_{(K1)}$, $\Delta S_{(K1)}$, $\Delta H_{(K1)}$ e das extrapolações dos ajustes lineares dos gráficos de van't Hoff obtidos em diferentes [NaCl].	91
Tabela 10: Comparação entre o ΔH , ΔS , ΔG , a variação do número de moléculas de H_2O , Cl^- e H^+ , que acompanham a oxigenação da Hb.	97
Tabela 11: Dependência do Δn_{wP50} e Δn_{wK1} com a [NaCl], medidos em pH 7,3 e 9,0.	112
Tabela 12: Valores de $\Delta n_{w(P50)}$, $\ln P_{50}$, $\Delta G_{(P50)}$, $\Delta S_{(P50)}$, $\Delta H_{(P50)}$ e das extrapolações dos ajustes lineares dos gráficos de van't Hoff obtidos em diferentes [NaCl], medidos em pH 7,3 e 9,0.	116
Tabela 13: Valores de $\Delta n_{w(K1)}$, $\ln K_1$, $\Delta G_{(K1)}$, $\Delta S_{(K1)}$, $\Delta H_{(K1)}$ e das extrapolações dos ajustes lineares dos gráficos de van't Hoff obtidos em diferentes [NaCl], medidos em pH 7,3 e 9,0.	116
Tabela 14: Comparação entre os valores de ΔH_{P50} obtidos em nossos experimentos e valores publicados por outros autores.	127
Tabela 15 : Comparação entre o ΔH de oxigenação total obtido pelo gráfico de $\ln P_{50} \times 1/T$ e o calculado pela equação integrada de van't Hoff.	154
Tabela 16: Comparação entre o ΔH de oxigenação para K_1 obtido pelo gráfico de $\ln K_1 \times 1/T$ e o calculado pela equação integrada de van't Hoff.	156
Tabela 17: ΔH , ΔG e ΔS de hidratação de diferentes grupos, estimados a partir da área de superfície acessível ao solvente.	158



Tabela 18: Parâmetros de solvatação de resíduos de aminoácidos apresentados por Oobatake e colaboradores.	159
Tabela 19: Energética de dissolução de alcanos (substâncias não-polares) da fase gasosa para a água em 25 °C.	160
Tabela 20: Parâmetros termodinâmicos de transferência de substâncias não-polares (hidrocarbonos) líquidas para a água.	160
Tabela 21: ΔG e ΔH de hidratação obtidos a partir da transferência da fase gasosa para a água, de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína.	161
Tabela 22: Parâmetros termodinâmicos de hidratação associados determinados tendo como base interações interatômicas que ocorrem com o desnovelamento protéico.	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,3 BPG	=	2,3-Bifosfoglicerato.
μM	=	Micromolar.
μm	=	Micrômetro.
Å²	=	Angstron quadrado.
Arg	=	Arginina.
Asp	=	Aspartato.
ATP	=	Adenosinatrifosfato.
Bis-Tris	=	(2 -Hidroxietyl) imino-(hidroximetil)metano.
EDTA	=	Ácido Etileno Diamino Tetracético.
FPLC	=	Aparelho utilizado para cromatografia líquida de baixa pressão.
g	=	Gravidade
Glu	=	Ácido glutânico.
Hepes	=	Ácido (2 Hidroxietyl) Piperazina - N - (2 Etano Sulfônico).
His	=	Histidina.
kD	=	Quilodalton.
Lys	=	Lisina.
M	=	Molar
mL	=	Mililitro.
mm	=	Milímetro
mM	=	Milimolar
mmHg	=	Milímetro de mercúrio.
mV	=	Milivoltz.
nm	=	Nanometro.
PAGE	=	Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida.
Tris	=	Tris(hidroximetil) aminometano.
V	=	Voltz
V/V	=	Volume por volume.
Val	=	Valina.



Caôn Filho, O. *Contribuição da solvatação à entalpia e entropia de oxigenação de hemoglobinas*. São José do Rio Preto, 2003, 164p. Defesa de Tese de Doutorado em Biofísica Molecular. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, campus de São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A hemoglobina liga oxigênio cooperativamente e sua afinidade aparente por este ligante é modulada pela interação com ligantes heterotrópicos do meio, tais como prótons, ânions fosfatos, cloreto e água. Esta proteína possui duas conformações alostéricas distintas em estrutura quaternária, a conformação T com baixa afinidade por O_2 e conformação R com alta afinidade por O_2 . O equilíbrio entre estes extremos conformacionais da Hb é determinado pelo número de O_2 que estão associados aos quatro sítios heme e pelo número diferencial de efetores alostéricos ligados a sítios presentes na superfície exposta pela proteína ao solvente.

Recentemente, foi determinado que a variação de hidratação associada a oxigenação da Hb (Δn_w) é modulada pela ligação preferencial de ânions a estrutura da desoxi-Hb (Colombo & Seixas, 1999). A ligação de Cl^- a desoxi-Hb leva a desidratação da proteína em $\cong 40 - 50$ moléculas de água e a diminuição da afinidade intrínseca de O_2 deste estado. Como consequência o Δn_w associado a transição desoxi-T $\rightarrow$ oxi-R varia significativamente, de 25 para 70 moléculas de água. Seguindo esta linha de pesquisa, determinamos a variação de calor e entropia associados com a transferência de grupos do interior da proteína para a água, a partir de reações de oxigenação realizadas em meio aquoso. Estes valores termodinâmicos foram estimados combinando a entalpia de van't Hoff e a variação de hidratação que acompanha a ligação do primeiro O_2 e a oxigenação total da Hb.

ABSTRACT No que se refere a oxigenação total da Hb, o custo entálpico, δH_w , para a proteína expor na sua superfície alguns grupos protéicos e hidrata-los subsequêntemente vale - 0,63 kcal/mol de H_2O . Por sua vez, o custo entrópico para fixar as moléculas de água, δS_w , é igual a - 2,40 cal/K mol de H_2O . A 298 K, a energia livre de hidratação resultante, δG_w , vale $\cong 100$ cal/mol de H_2O . Enquanto que para a ligação do $1^o O_2$ (K_1), o custo entálpico, δH_w vale - 0,61 kcal/mol de H_2O , o entrópico, δS_w , é igual a - 2,18 cal/K mol e a energia livre de hidratação resultante, δG_w , vale $\cong 40$ cal/mol de H_2O . Com a finalidade de determinar a natureza da energética de hidratação que esta associada com a oxigenação da Hb, confrontamos, via gráficos de compensação, os valores de δH_w , δS_w e δG_w determinados tanto para a oxigenação total quanto para K_1 , com os valores dos parâmetros de solvatação calculados a partir da transferência de pequenos compostos químico de líquidos hidrofóbicos (ou da fase gasosa) para a água. O resultado encontrado mostra que o ΔH e ΔS que acompanham as mudanças conformacionais da Hb segue a mesma linha de compensação associada com a transferência de grupos hidrofóbicos de líquidos apolares para a água. Isto sugere que a energética de hidratação associada com a oxigenação da Hb possui característica hidrofóbica.

Palavras – chave: hemoglobina, hidratação, entalpia e entropia.

ABSTRACT

The hemoglobin binds oxygen cooperatively and its apparent affinity to this ligand is modulated by its interaction with heterotropic ligands of the environment, such as protons, phosphate anions, chloride and water. This protein has two distinct allosteric conformations in its quaternary structure: conformation T, with low affinity to O_2 and conformation R, with high affinity to O_2 . The equilibrium between these Hb conformational extremes is determined by the number of O_2 binded to the four heme sites and by the number of allosteric effectors associated to sites present in the surface exposed by the protein to the solvent during the transition $T \rightarrow R$.

It has been recently determined that the variation on hydration, associated with the Hb oxygenation (Δn_w), is modulated by the preferential bind of anions to the structure of deoxy-Hb (Colombo & Seixas, 1999). The bind of Cl^- to deoxy-Hb leads to protein dehydration in $\cong 40$ -50 water molecules and to diminution of intrinsic affinity to O_2 of this state. As a consequence, the Δn_w , associated with the transition $T \rightarrow R$ varies significantly, from 25 to 70 water molecules. Following this line of research, we have determined the heat variation and the entropy associated with the transfer of groups from the inner of the protein to the water, considering oxygenation reactions performed in water medium. The thermodynamic values were estimated combining van't Hoff enthalpy and the variation of hydration that follows the bind of the first O_2 and the Hb total oxygenation.

Concerning Hb total oxygenation, the enthalpic cost, δH_w , for the protein to expose some proteic groups on its surface and hydrate them, is $-0,63$ kcal/mol of H_2O . On the other hand, the entropic cost to attach the water molecules, δS_w , is $-2,40$ cal/K mol of H_2O . In 298 K, the free

energy of resulting hydration, δG_w , is worthy $\cong 100$ cal/mol de H_2O . To bind the first O_2 molecule (K_1), the enthalpic cost, δH_w , is - 0,61 kcal/mol of H_2O , the entropic cost, δS_w , is - 2,18 cal/K mol and the free energy from the resulting hydration, δG_w , is $\cong 40$ cal/mol of H_2O . Aiming at determining the nature of the hydration energetic, which is associated with the Hb oxygenation, we have confronted, through compensation graphs, the δH_w , δS_w and δG_w values determined to the total oxygenation and to K_1 with the values of the parameters of solvation calculated from the transferring of small chemical composites of hydrophobic liquids (or from the gaseous phase) to the water. The result shows that the ΔH and ΔS that follow the Hb conformational changes have the same compensation line, associated with the transfer of hydrophobic groups of apolar liquids to the water. This suggests that the hydration energetic associated with the Hb oxygenation has a hydrophobic characteristic.

Key-words: hemoglobin, hydration, enthalpy, entropy.

1.1 - HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína encontrada principalmente nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados, sendo a sua principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões (Baldwin, 1975). A Hb tem o formato globular, com diâmetro de 6,4 nm e massa molecular de aproximadamente 64,5 kD (Imai, 1983; Stryer, 1990; Voet & Voet, 1995). Quatro subunidades polipeptídicas compõem a Hb, como mostra a Figura 1. Cada subunidade contém um grupo prostético heme, o qual é um complexo de protoporfirina IX e um átomo de ferro no estado ferroso, Fe^{2+} (Baldwin, 1975).

1 – INTRODUÇÃO

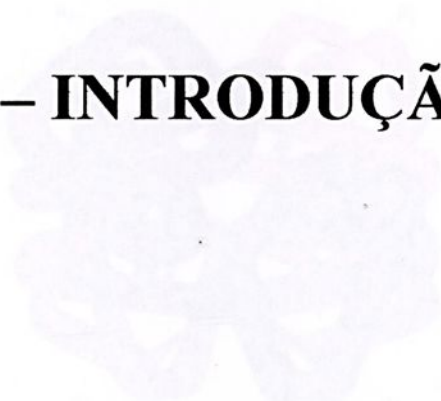


Figura 1: Hemoglobina humana (Hb) adulta. Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (cadeia verde) e duas cadeias β (cadeia amarela). Cada cadeia contém um grupo heme, que é um anel prostético contendo um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Figura extraída de Garavito & Garavito, 1995.

O oxigênio liga-se reversivelmente ao átomo de ferro presente no grupo heme, formando quatro moléculas de gás por molécula de proteína. A reversibilidade desta reação é possível devido as cadeias polipeptídicas que rodeiam o grupo heme, mantendo-o em um "bolsão" hidrofóbico (Baldwin, 1975). O Fe^{2+} da Hb pode ser oxidado a Fe^{3+} e

1.1 - HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína encontrada principalmente nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados, tendo como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões (Baldwin, 1975). A Hb tem o formato globular, com diâmetro de 6,4 nm e massa molecular de aproximadamente 64,5 kD (Imai, 1982; Stryer, 1996; Voet & Voet, 1995). Quatro subunidades polipeptídicas compõem a Hb, como mostra a figura 1. Cada cadeia contém um grupo prostético heme, o qual é um complexo de protoporfirina IX e um átomo de ferro no estado ferroso, Fe^{+2} (Baldwin, 1975).

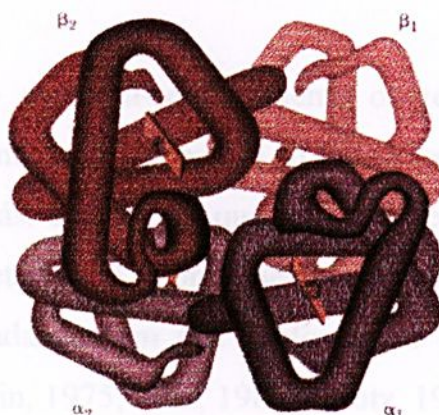


Figura 1: Hemoglobina humana (Hb A₀). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (cinza claro e cinza escuro) e duas cadeias β (marrom claro e marrom escuro) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada uma, respectivamente. Figura extraída de Garrett e Grisham, 1995.

O oxigênio liga-se reversivelmente ao átomo de ferro presente no grupo heme, totalizando quatro moléculas do gás por molécula de proteína. A reversibilidade desta reação é possível devido as cadeias polipeptídicas enoveladas que circundam o grupo heme, mantendo-o em um “bolsão” hidrofóbico (Baldwin, 1975). O Fe (II) da Hb pode ser oxidado a Fe (III) e

formar meta-hemoglobina (meta-Hb), que não liga O_2 . O estado ferroso é mantido tanto na forma oxigenada como na forma desoxigenada (Baldwin, 1975). Vale citar que os eritrócitos contêm a enzima meta-Hb redutase, que converte pequenas quantidades de meta-Hb, formadas espontaneamente, ao estado ferroso (Voet & Voet, 1995).

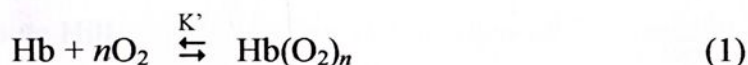
Os seres humanos adultos apresentam duas frações de hemoglobinas nos eritrócitos, a Hb A₁ que corresponde à aproximadamente a 98% do total de hemoglobina e a Hb A₂, que representa algo em torno de 2% do total da proteína (Stryer, 1996). A molécula de Hb A₁ é um tetrâmero do tipo $\alpha_2\beta_2$, constituída por duas cadeias α e duas cadeias β , com 141 e 146 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Por sua vez, a hemoglobina A₂, contem duas cadeias δ , no lugar das cadeias β da Hb A₁ (Mathews & van Holde, 1990).

Quando a Hb encontra-se totalmente oxigenada a estrutura que prevalece é a conformação R (relaxada) ou forma oxi; já quando ela não se encontra ligada ao gás, a estrutura que prevalece é a T (tensa) ou forma desoxi (Voet & Voet, 1995). Consequentemente a ligação de O_2 a esta proteína induz a mudanças em sua conformação terciária e quaternária (Perutz, 1970; Baldwin, 1975; Imai, 1982; Perutz, 1989).

1.2 - A LIGAÇÃO COOPERATIVA DO O_2

O transporte de O_2 é a principal função da Hb. A dependência da saturação da Hb por O_2 com a pressão parcial de oxigênio é descrita pela “Curva de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio”. A primeira tentativa de analisar esta curva foi formulada por Archibald Hill em 1910 (Voet & Voet, 1995) que considerou a ligação de O_2 como sendo representada genericamente pela equação de equilíbrio :





onde K' é a constante de associação e n representa o número de moléculas de oxigênio que se associa à proteína. Por definição:

$$K' = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n} \quad (2)$$

onde $[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]$ é a concentração da hemoglobina totalmente oxigenada, $[\text{Hb}]$ é a concentração da hemoglobina totalmente desoxigenada e $[\text{O}_2]$ é a atividade do oxigênio livre em solução (Baldwin, 1976).

De acordo com a lei de Henry, a concentração de oxigênio na fase líquida é proporcional à pressão parcial do gás na fase gasosa (Atkins, 1999) dessa maneira, a atividade de O_2 é dado por:

$$[\text{O}_2]_{\text{solução}} = p\text{O}_2 \cdot K_H \quad (3)$$

sendo K_H , a constante de solubilidade do O_2 na solução (constante de Henry). Combinando as equações 2 e 3 podemos escrever:

$$\frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}]} = K \cdot (p\text{O}_2)^n \quad (4)$$

onde $K = K' \cdot (K_H)^n$.

Expressando a equação 4 em termos de saturação fracional¹ de O₂ ($\bar{Y}$) obtemos a equação de Hill.

$$\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}} = K(pO_2)^n \quad (5)$$

A forma logarítmica da equação 5 resulta:

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = n \cdot \log(pO_2) + \log K \quad (6)$$

O gráfico de $\log(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\log(pO_2)$, gráfico de Hill, para a ligação de O₂ à hemoglobina, é mostrado na figura 11 (página 57) desta tese. A característica marcante desta figura é o formato sigmoidal apresentado pela curva de oxigenação. Este formato descreve a interação cooperativa entre os sítios de ligação da proteína, isto é, mostra que a associação do primeiro ligante favorece a ligação do segundo, e assim sucessivamente (Baldwin, 1976). No caso da Hb, a ligação da primeira molécula de O₂ aumenta a afinidade da proteína para a ligação da segunda molécula e assim por diante. A cooperatividade é expressa pelo coeficiente de Hill (n_{50}), que é obtido da inclinação do gráfico $\log(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\log(pO_2)$, conforme a expressão abaixo.

$$n_{50} = \left. \frac{\partial \ln(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))}{\partial \ln pO_2} \right|_{\bar{Y}=0.5} \quad (7)$$

¹ Saturação fracional é a razão entre o número de sítios ligados e o número total de sítios.

A determinação de n_{50} ocorre no intervalo de saturação de 20 a 80%. Um valor de $n_{50} > 1$, que caracteriza uma curva sigmoidal, indica a presença de sítios idênticos com diferentes afinidades pelo ligante (Matheus & van Holde, 1990). Para Hbs de mamíferos em condições fisiológicas normais o valor de n_{50} está entre 2,8 e 3,0 (Stryer, 1996).

Estudos cristalográficos e termodinâmicos que mostram as diferenças entre as estruturas totalmente desoxigenada e totalmente oxigenada, sugerem que a mudança conformacional na estrutura quaternária da proteína é responsável pela cooperatividade entre os sítios de ligação de O_2 à Hb (Baldwin, 1975; Kilmartin et al., 1978; Perutz, 1989; Ackers et al., 1992), conforme o modelo de cooperatividade de dois estados proposto por Monod, Wyman e Changeaux (Monod, et al., 1965). No modelo MWC, a ligação cooperativa de O_2 à hemoglobina é explicado supondo o equilíbrio de duas conformações protéicas quaternárias, de distintas afinidades pelo ligante, como representado no esquema abaixo:



T e R representam, respectivamente, as estruturas de baixa e alta afinidade ao O_2 . Neste modelo a medida que a Hb é oxigenada, a afinidade da proteína por O_2 aumenta devido ao deslocando do equilíbrio (Desoxi (T) $\rightleftharpoons$ Oxi (R)) na direção da estrutura de maior afinidade R.

A afinidade da Hb por oxigênio (P_{50}), que expressa o valor da pO_2 quando 50% dos sítios de ligação de O_2 da proteína estão saturados, e a constante de associação da primeira molécula de O_2 à Hb (K_1) são outros parâmetros funcionais obtidos do gráfico de Hill como mostra a figura 11.



1.3 - REGULAÇÃO ALOSTÉRICA

A ligação cooperativa do oxigênio à Hb é um exemplo de interações alostéricas, isto é, a ligação de um ligante a um sítio da proteína, influencia a afinidade de interação dos demais sítios não ligados. Estas interações ocorrem entre ligantes do mesmo tipo, e neste caso o O_2 (interações homotrópicas), ou de tipos diferentes (heterotrópicas), H^+ , CO_2 , ATP, 2,3-DPG, Cl^- (Monod, et al., 1965; Imai, 1982), e como mostrado recentemente, a água, (Colombo et al., 1992).

O efeito das interações alostéricas é bem explicado pelo modelo de dois estados (modelo de MWC). Neste modelo os autores propuseram que as proteínas alostéricas apresentam organização oligomérica, ou seja, são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica (subunidade) e tem mais de um sítio de ligação a ligantes por molécula de proteína (Matheus & van Holde, 1990; Voet & Voet, 1995; Garrett & Grisham, 1995). Portanto, qualquer molécula que se ligue mais fortemente a uma ou outra estrutura (T ou R) ou com estequiometria diferente entre estes dois estados conformacionais, afetará o equilíbrio alostérico. Consequentemente, a interação destes ligantes heterotrópicos modula a afinidade da proteína por O_2 através de mudanças no equilíbrio alostérico (Stryer, 1996).

Nos próximos sub-itens deste capítulo comentaremos sobre os efetores heterotrópicos utilizados neste trabalho e como suas variações de concentração possibilitaram o estudo da relação estrutura e função da Hb, investigando as mudanças conformacionais induzidas na proteína pela ligação destes ligantes através de medidas de variação de hidratação, variação de entalpia e entropia associadas à oxigenação da Hb.

1.3.1 – Efeito de água.

A comparação entre as conformações oxi e desoxi da hemoglobina mostra que vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente durante a transição T→R. Esta mudança estrutural implica numa diferença de superfície protéica exposta ao solvente entre estas conformações e, conseqüente, ligação de moléculas de água à proteína com a oxigenação, uma vez que a estrutura oxigenada é mais hidratada que a estrutura desoxigenada (Colombo et al., 1992, Srinivasan & Rose, 1994). Este efeito se reflete na dependência da afinidade da Hb por O₂ com a atividade de água.

O papel da água sobre o controle alostérico tem sido estudado pelo método de estresse osmótico, usando como modelo a oxigenação da Hb (Colombo et al., 1992). O princípio deste método, proposto por Colombo e colaboradores, reside em usar solutos neutros, como açúcares e polióis, para ajustar a atividade de água da solução. Estes solutos são preferencialmente excluídos da superfície da proteína (Timasheff & Arakawa, 1982), tornando pouco provável sua interação direta com a proteína.

Estudos anteriores (Haire & Hedlund, 1983) mostraram que o aumento da concentração do soluto neutro (etileno glicol) na solução de Hb, acarreta num aumento no valor de P₅₀, ou seja, na diminuição da afinidade da proteína por O₂. Essa relação inversamente proporcional ocorre sem que haja alteração na cooperatividade e foi interpretada, por aqueles autores, como devido a uma ligação preferencialmente fraca do soluto a desoxi-Hb.

Em sua análise do efeito dos solutos neutros sobre as características de ligação de O₂ à Hb, Colombo e colaboradores consideraram dois casos: (a) a ligação direta do soluto com a proteína e (b) o efeito indireto do soluto



sobre a atividade de água. Para fazer a distinção entre estes dois casos os autores utilizaram solutos diferentes, sendo encontrado uma dependência comum entre a afinidade por O_2 e a atividade de água (Colombo et al., 1992, 1994, 1996). Esta independência em relação à natureza do soluto, reforça a suposição da exclusão destes solutos pela camada de solvatação que envolve a proteína, e de qualquer espécie de interação direta com as estruturas T ou R.

Conforme sugerido por Colombo e colaboradores (Colombo et al., 1992; Parsegian et al., 1995) o efeito de solvatação pode ser determinado quantitativamente em termos do número diferencial de moléculas de água ligadas entre os dois extremos conformacionais da proteína através da utilização das equações de “linkage” propostas por Wyman (Wyman, 1964).

A equação de “linkage” que determina o número diferencial de moléculas de um ligante L que se liga à Hb com ligação de oxigênio é expressa da seguinte forma:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{(n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}})}{4} \quad (9)$$

onde P_{50} tem o significado antes citado; a_L é a atividade do ligante L, a_i corresponde a atividade de outros ligantes que não L, Δn_L é o número diferencial de moléculas de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb e 4 é o número de sítios de ligação de O_2 existentes na proteína. Esta análise é correta apenas quando a atividade de um ligante varia e a atividade de qualquer outro ligante presente na solução é mantida constante. Quando o ligante alostérico L é a água, esta relação pode ser escrita como:

$$-\left. \frac{d \ln P}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}}{4} = \frac{\Delta n_w}{4} \quad (10)$$

onde, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, Δn_w é o número diferencial de moléculas de água ligadas entre as estruturas oxi e desoxi da Hb e a_i é a atividade de um ligante i , diferente da água (Colombo et al., 1992).

A partir desta equação Colombo e colaboradores (1992) determinaram que aproximadamente 70 moléculas de água são ligadas à Hb humana, com a sua oxigenação. Este valor de Δn_w esta de acordo com a maior superfície exposta pela proteína durante a transição T→R, vindo a preencher a camada de hidratação desta estrutura. Vale citar que as 70 moléculas de água foram determinadas em vários experimentos realizados na presença de 100 mM de NaCl (Colombo et al., 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996).

1.3.2 – Efeito do íon cloreto.

Outro efetor alostérico fisiologicamente importante é o íon cloreto que contribui para a regulação da afinidade da Hb por oxigênio de forma a reduzi-la, estabilizando assim, a estrutura desoxi-Hb (T) (Perutz et al., 1994).

Durante muitos anos acreditava-se que os íons cloreto ligavam-se à sítios específicos da proteína; a Val 1 do α_2 amino grupo do N-terminal e a Arg 141 α_1 do grupo guanidino do resíduo C terminal (Kilmartin et al., 1978). Recentemente, entretanto, Perutz e colaboradores (Perutz et al.,

1993 e 1994) propuseram que a regulação da afinidade pelo ligante O_2 por Cl^- ocorre via interações eletrostáticas não específicas (Perutz et al., 1994). Segundo esta proposição, o ânion cloreto atua neutralizando o excesso de cargas positivas existentes na região da cavidade central da desoxi-Hb por condensação iônica (Perutz et al., 1993).

O excesso de cargas positivas na cavidade central da desoxi-Hb se deve a presença de oito resíduos catiônicos (cadeia α : Val 1, Lys 99, His 103; cadeia β : Val 1, His 2, Lys 82, Arg 104 e His 143) e três resíduos aniônicos (cadeia α : Asp 95 e 126; cadeia β : Glu 101) (Perutz et al., 1993). O fato da quantidade de cargas positivas ser maior promove o aparecimento de uma repulsão eletrostática entre as mesmas, desestabilizando assim, a estrutura T da Hb e deslocando o equilíbrio conformacional para a estrutura de alta afinidade pelo oxigênio (estrutura R).

Para formular esta hipótese, Perutz e colaboradores em 1994, basearam-se em estudos de oxigenação de Hbs mutantes, que possuem deleções de um ou mais resíduos de aminoácidos que contribuem com as cargas positivas da cavidade. Estes pesquisadores notaram que o efeito dos íons cloretos sobre a afinidade da Hb por O_2 ($\Delta \log P_{50} / \Delta \log [Cl^-]$), diminuiu a medida que o número de resíduos positivos são deletados, e que o caminho inverso também é verdadeiro.

Dado que o Cl^- interage fracamente com a Hb, seu efeito é observado à altas concentrações (>10 mM). Nestas soluções salinas a atividade de água varia significativamente podendo alterar o equilíbrio entre as conformações R e T devido a diferença de hidratação entre estas estruturas. Em recente reavaliação da ação alostérica que os íons cloretos exercem sobre a oxigenação da Hb constatou-se que sua atuação também se dá de forma indireta, isto é, via efeito de sua concentração na atividade de água da solução (Colombo et al., 1994). Mantendo fixa a atividade de água,

Colombo e colaboradores encontraram que a transição da estrutura totalmente desoxigenada (T) para a oxigenada (R) é acompanhada pela liberação aparente de um simples íon de cloreto ($\Delta n_{Cl^-} = 1.02$) e ligação de $\cong 70$ moléculas de água (Colombo et al., 1994).

Em outro trabalho Colombo e Seixas (1999) verificaram como o valor de Δn_w de oxigenação da Hb humana e bovina varia com a concentração de NaCl. Estes autores mostraram que a variação de hidratação associada à oxigenação da Hb é modulada pela ligação preferencial de ânions à estrutura da desoxi-Hb. Os experimentos revelaram que a mudança conformacional da desoxi-Hb para a oxi-Hb em soluções com até 1 mM de NaCl, é acompanhada por um Δn_w de 25 moléculas de água. Por sua vez, 70 moléculas de água foi o valor da variação de hidratação associada com a transição T $\rightarrow$ R determinada em [NaCl] maior que 50 mM.

1.3.3 - A existência de estados intermediários da Hb durante sua oxigenação.

Para interpretar o efeito da concentração de NaCl sobre o Δn_w Colombo e Seixas (1999) propuseram que a desoxi-Hb coexista em duas conformações alostéricas distintas: a clássica T, estabilizada quando íons Cl^- estão ligados a esta estrutura, que denominaremos T_x e uma outra estrutura T, sem ânions ligados, que denominaremos T_0 . As medidas da variação de hidratação em função da concentração de NaCl mostram uma típica transição entre dois estados, um estabilizado em baixas e outro em altas concentrações de ânions.

Este novo modelo proposto para a oxigenação da Hb concilia os dois estados clássicos da proteína (R e T) com um novo estado intermediário T_0 .



A transição do estado T_x para R passa pelo estado intermediário T_0 , no qual ânions são liberados da estrutura com a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado desoxi-Hb (T_0) é estabilizado e a transição passa a ser de T_0 para R, com uma pequena variação de hidratação.

Parte deste trabalho estende os estudos anteriormente realizados, sobre o efeito do Cl^- na oxigenação da estrutura da Hb humana através de medidas da dependência da afinidade da Hb por O_2 , P_{50} , e da constante de ligação do primeiro ligante à proteína, K_1 , com a atividade de água. Estes experimentos permitiram a determinação da variação de hidratação associada à transição da desoxi-Hb para a oxi-Hb, e associada a mudanças na conformação protéica devido a ligação do primeiro ligante.

1.3.4 – Efeito da temperatura.

Durante a transição estrutural do estado de baixa afinidade – T_x para o estado de alta afinidade – R da Hb, várias pontes salinas são quebradas e os contatos presentes nas estruturas terciária e quaternária são refeitos, tal que vários grupos são expostos ao solvente. Como consequência, ligantes heterotrópicos, tal como, prótons e ânions que interagem preferencialmente com o estado T_x são liberados, e uma quantidade extra de água liga-se a nova superfície exposta ao solvente pelo estado R. Em função dessa reorganização estrutural da proteína e do solvente, variações de calor (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre total (ΔG), de oxigenação da Hb são percebidas. Para quantificar as variações das grandezas termodinâmicas mencionadas acima se faz necessário verificar a dependência mútua entre as curvas de oxigenação obtidas em diferentes temperaturas e na presença de efetores alostéricos.



Experimentos onde determinamos o efeito que a temperatura causa na determinação da variação de hidratação que acompanha a oxigenação da Hb foram realizados. Gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ foram construídos entre 15 e 35 °C e com os resultados, determinamos o comportamento do ΔH de oxigenação em soluções com diferentes atividades de água. A partir daí, a natureza entálpica e entrópica do ΔG de oxigenação da proteína pode ser caracterizada.

Em outra etapa deste trabalho, curvas de equilíbrio de oxigenação da Hb foram obtidas em várias concentrações de NaCl em cinco temperaturas. Estes experimentos possibilitaram a determinação da variação de entalpia e entropia associados a transição entre a Hb totalmente desoxigenada e a totalmente oxigenada a partir de gráficos de $\ln P_{50}$ versus $1/T$. A variação de entalpia associada à ligação do 1º oxigênio, a partir de gráficos de $\ln K_1$ versus $1/T$ também foi determinada. A dependência do calor (ΔH) e da entropia de oxigenação (ΔS) com a $[Cl^-]$ observada é semelhante àquela apresentada pela variação de hidratação associada à oxigenação da Hb (Δn_w) em função da concentração deste íon (Colombo & Seixas, 1999).

A análise deste conjunto de dados mostrou que ΔH e ΔS de oxigenação são linearmente correlacionadas com o Δn_w da proteína. Este resultado possibilitou a determinação do calor e da entropia que esta associada com a transferência de um mol de água do volume da solução para a superfície protéica.

A primeira etapa do trabalho foi a caracterização do solo de estudo, visando determinar a sua composição química e física, bem como a sua capacidade de troca catiônica. Para isso, foram coletadas amostras de solo em diferentes profundidades (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 cm) e analisadas em laboratório. Os resultados das análises foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

2 - OBJETIVOS

- 1) Determinar a concentração de nutrientes no solo de estudo, visando avaliar a sua fertilidade e a necessidade de adubação.
- 2) Avaliar a capacidade de troca catiônica do solo de estudo, visando determinar a sua capacidade de reter e fornecer nutrientes para as plantas.

A avaliação experimental da contribuição energética da solvatação para a estabilidade de macromoléculas biológicas e para o controle de reações bioquímicas permanece muito pouco explorada, apesar de sua importância para o completo entendimento dos mecanismos de ação destas moléculas. Em parte, esta lacuna deve-se a ausência, até recentemente, de uma metodologia experimental adequada à determinação da estequiometria de ligação de água associada a reações bioquímicas em solução. A proposição do método do estresse osmótico por Colombo e colaboradores suplantou esta lacuna (Colombo et al., 1992, 1994, 1996).

Neste trabalho a entalpia e entropia de solvatação foram avaliadas a partir de medidas de ΔH e Δn_w associadas à reação de Hb com O_2 em solução. Como mencionado, anteriormente, esta proteína liga oxigênio cooperativamente e modula a sua afinidade por este ligante interagindo com efetores heterotrópicos, como prótons, fosfatos orgânicos, ânions cloreto e água, entre outros, assumindo assim diferentes estruturas terciárias e quaternárias em solução. Logo, a transição conformacional induzida pela ligação de oxigênio acarreta mudanças na superfície de hidratação e nos parâmetros energéticos associados. Em tese, as medidas de Δn_w e ΔH de oxigenação da Hb e a dependência destas quantidades com a $[Cl^-]$ em solução pode permitir a determinação da entalpia, entropia e energia livre associadas à solvatação.

Com base nestas informações o presente trabalho objetivou:

- 1) Determinar as isotermas de oxigenação da Hb em diversas condições experimentais, combinando diferentes valores de atividade de água, Cl^- e pH em solução a diferentes temperaturas.
- 2) A partir destes dados experimentais determinar o efeito da atividade de água, Cl^- , pH e temperatura sobre a afinidade da Hb por O_2 , P_{50} , e sobre K_1 ,

a constante de ligação do primeiro oxigênio à Hb. Proceder a análise quantitativa destes dados para a determinação:

- a) da variação de entalpia e entropia associadas a oxigenação total e a ligação do primeiro O_2 à Hb em pH 7,3 e 9,0, e diferentes $[NaCl]$.
- b) da diferença de hidratação entre a hemoglobina totalmente oxigenada, $Hb(O_2)_4$, e totalmente desoxigenada, Hb, e da diferença de hidratação entre a hemoglobina com o primeiro O_2 ligado, $Hb(O_2)_1$, e a hemoglobina totalmente desoxigenada, Hb, à diferentes temperaturas, diferentes atividades de Cl^- , e distintos pHs.

3) Analisar globalmente estes dados, considerando a partição da variação de entalpia de reação observada em suas diversas contribuições, isto é, nos calores associados:

- a) à mudanças conformacionais da Hb, $\Delta H_{conf.}$, induzidas pela ligação de ligantes homotrópicos (O_2) e heterotrópicos (H^+ , Cl^- , H_2O).
- b) à ligação de O_2 aos grupos heme, ΔH_{O_2} .
- c) à ligação de n_i ligantes heterotrópicos com calor intrínseco ΔH_i , onde $i = H^+$, Cl^- e H_2O . Com esta análise global objetivamos determinar a contribuição da entalpia e entropia de solvatação (isto é, o termo conformacional mais a hidratação) para a energética de oxigenação de Hb.

4) Comparar os dados e determinar a natureza da energética de hidratação da proteína, confrontando os valores de ΔH e ΔS de sua oxigenação com os valores das variações de calor e entropia de transferência, derivadas de sistemas modelo, $\Delta H_{transf.}$ e $\Delta S_{transf.}$, via gráficos de compensação.



3.1 - Purificação da heparina

O procedimento experimental utilizado na purificação da heparina foi baseado no método descrito por Williams e colaboradores (1977) e adaptado para a purificação da heparina. A heparina foi obtida a partir de tecido conjuntivo de porco e submetida a uma série de tratamentos para remoção de impurezas. O primeiro passo foi a remoção de proteínas e lipídios por tratamento com solução de cloreto de sódio e água. Em seguida, a heparina foi tratada com solução de ácido clorídrico para remoção de sais. O produto foi então tratado com solução de ácido acético para remoção de impurezas. O produto final foi a heparina purificada, que foi submetida a uma série de análises para determinar sua pureza e atividade biológica.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental utilizado na purificação da heparina foi baseado no método descrito por Williams e colaboradores (1977) e adaptado para a purificação da heparina. A heparina foi obtida a partir de tecido conjuntivo de porco e submetida a uma série de tratamentos para remoção de impurezas. O primeiro passo foi a remoção de proteínas e lipídios por tratamento com solução de cloreto de sódio e água. Em seguida, a heparina foi tratada com solução de ácido clorídrico para remoção de sais. O produto foi então tratado com solução de ácido acético para remoção de impurezas. O produto final foi a heparina purificada, que foi submetida a uma série de análises para determinar sua pureza e atividade biológica.

3.1.1 Montagem do Sistema de Cromatografia

O sistema de cromatografia utilizado consistiu em uma coluna de 100 cm x 4,6 mm ID, preenchida com sílica gel 60 µm (Pharmacia). A coluna foi conectada a um sistema de injeção e detecção. O fluxo de fase móvel foi controlado por uma bomba de gradiente.

Para a separação da heparina, foi utilizado um gradiente de NaCl. A fase móvel foi composta por água desionizada e solução de NaCl. O fluxo de fase móvel foi controlado por uma bomba de gradiente. A detecção foi realizada por um detector de absorção UV.

3.1 - Purificação da hemoglobina.

O procedimento experimental utilizado na purificação da hemoglobina humana é baseado na metodologia proposta por Willians e Tsay. As amostras de sangue humano forão coletadas por punção intravenosa em seringa heparinizada, de indivíduos adultos, sadios e não fumantes. O plasma foi retirado por centrifugação a 2500 g. As hemácias forão lavadas cinco vezes em solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 + EDTA 1 mM) onde o volume de tampão adicionado foi três vezes maior que o volume de hemácias decantadas. A hemólise ocorreu com a adição de solução tampão hipotônica Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8,5. O passo seguinte, a retirada de "debris", procedeu com a adição de clorofórmio (Merck) no mesmo volume que a solução da amostra, sob agitação constante. Em seguida centrifugou-se a amostra a 2.300 g por 120 minutos (Willians & Tsay, 1973).

O sobrenadante foi filtrado em membrana Milipore 1,2 μ m e a amostra foi dialisada contra 4 L de tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 1 mM em pH 8,5 por 12 horas para remoção de fosfatos.

3.1.1) Montagem da Coluna de Cromatografia

Na coluna de cromatografia utilizamos como tampão A (inicial), Tris-HCl 15 mM em pH= 8,4 e como tampão B (final), BisTris-HCl 15 mM em pH = 7.

Cerca de 1,5 g de resina DEAE-SEPHADEX A - 50 (Pharmacia), foram adicionadas em aproximadamente de 300 mL de tampão A por 12 horas, antes da montagem da coluna XK-50 (Pharmacia), sendo este o tempo indicado pelo fabricante para a hidratação da resina. A coluna foi



posteriormente montada em temperatura ambiente e equilibrada em câmara fria à temperatura de próxima a 4° C com tampão A.

3.1.2) Eluição da Amostra

Com a coluna equilibrada, a amostra de Hb foi aplicada à mesma e lavada com tampão A ($\cong$ 700 mL) por 12 horas. Em pH 8,4 a proteína possui carga efetiva negativa, o que resulta na retenção da Hb pelos cátions da resina. O passo seguinte foi acoplar a coluna a um sistema de FPLC modelo LKB da Pharmacia e a um banho térmico com temperatura constante em 4° C. O FPLC forma um gradiente de pH devido a mistura de frações de tampão A e B, permitindo assim a eluição da amostra no decorrer coluna. O gradiente foi iniciado em 50% (V/V) de tampão A e B, e a concentração de tampão B é gradativamente elevada até atingir 100%. O fluxo de saída de tampão pela coluna foi de 4 mL/min.

Quando o gradiente atingir a fração de 75% de tampão B ocorre o desprendimento da Hb A₂, que representa aproximadamente 2% do total de Hb (para um indivíduo normal). O pH deste gradiente é próximo a 7,9 (que equivale ao ponto isoeletrico da Hb A₂ a 4° C). Com o início da eluição da Hb A₂, o gradiente de pH foi mantido constante para a saída desta fração protéica. Em seguida, o gradiente é elevado a aproximadamente 100% de tampão B, onde ocorre o desprendimento da fração de Hb A₁. Após a eluição desta fração, a amostra foi concentrada utilizando concentradores de membrana Amicon, até um volume de aproximadamente 50 mL. A seguir, esta amostra é passada, por no mínimo cinco vezes, em uma coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA, para desionização da solução. O procedimento de concentração por centrifugação em microconcentrador Amicon é repetido e as alíquotas de Hb são estocadas



em N₂ líquido. Ao final destes procedimentos, a Hb A₁, isenta de quaisquer ânions passa a ser denominada Hb A₀.

Para checar a purificação da Hb, alíquotas da proteína foram submetidas a uma eletroforese não desnatante - PAGE, corada por impregnação de nitrato de prata (Laemmli et al., 1970). A figura 2 mostra as frações de Hb humana antes e após a purificação.

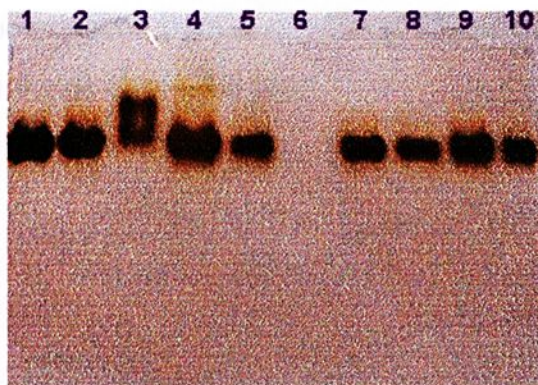


Figura 2: Eletroforese em gel de Poli-acrilamida a 7%, pH 9,16, não desnatante. As bandas nas posições 1, 2, 5, 7, 8, 9 e 10 representam a fração de Hb A₀ após a purificação; a banda na posição 3 representa a fração de Hb A₂ separada por cromatografia de troca iônica e a banda na posição 4 representa a fração de Hb antes da purificação.

O gel de poli-acrilamida, apresentado acima, comprova que a Hb A₀, obtida a partir desta metodologia, proposta originalmente por Willians e Tsay (1973), esta pura. As bandas nas posições 1, 2, 5, 7, 8, 9 e 10 representam a fração de Hb A₀ após a purificação, nota-se a presença de apenas uma fração em cada posição e a banda na posição 3 representa a fração de Hb A₂ separada por cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex A-50 com gradiente de pH (nota-se a presença de duas frações) enquanto que a banda na posição 4 representa a fração de Hb antes da purificação (nota-se a presença de três frações).

3.2 – Determinação da concentração proteica.

A determinação da concentração protéica foi realizada com base no método quantitativo espectrofotométrico (Riggs, 1981). O espectrofotômetro utilizado em nossos experimentos foi um aparelho Varian Cary 3Bio UV – Visible. A equação 12 possibilita o cálculo da concentração da proteína, [Hb], a partir das absorbâncias (Abs) aferidas em um dos picos característicos para a oxi-Hb (543 ou 576 nm) e do valor correspondente à linha de base (700 nm):

$$[\text{Hb}] = \frac{(\text{Abs}_{576} - \text{Abs}_{700}) \cdot (V_{\text{diluição}} + V_{\text{Hb}})}{(\epsilon_{576} \cdot V_{\text{Hb}})} \quad (12)$$

A [Hb] é expressa em mM/heme, $V_{\text{diluição}} + V_{\text{Hb}}$, representa o volume total da amostra na cubeta e ϵ_{576} o coeficiente de extinção molar para a oxi-Hb em 576 nm (Benesch et al., 1973).

A formação de meta-Hb (oxidação do ferro presente no grupo heme da Hb, $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) pode interferir nos resultados da oxigenação desta proteína. Para evitar a oxidação do átomo de Fe, alíquotas de catalase e superóxido dismutase são adicionadas à solução de Hb (Benesch et al., 1973). Ao final de cada experimento a concentração de meta-Hb, foi dosada seguindo as equações descritas por Riggs (Riggs, 1981):

$$A_{576} = [\text{oxiHb}] \epsilon_{576}^{\text{oxi}} + [\text{metaHb}] \epsilon_{576}^{\text{meta}} \quad (13)$$

$$A_{630} = [\text{oxiHb}] \epsilon_{630}^{\text{oxi}} + [\text{metaHb}] \epsilon_{630}^{\text{meta}} \quad (14)$$

onde, [metaHb] e [oxiHb] são as concentrações molares da proteína oxidada e não oxidada, respectivamente. Os valores dos coeficientes de extinção molar, a pH 7,2, e nos comprimentos de ondas de 630 e 576 nm tanto para a oxi-Hb, quanto para a meta-Hb são dados na tabela a seguir.

	oxi-Hb	meta-Hb
$\epsilon_{576} (M^{-1}.cm^{-1})$	$1,58 \times 10^4$	$0,414 \times 10^4$
$\epsilon_{630} (M^{-1}.cm^{-1})$	$0,014 \times 10^4$	$0,376 \times 10^4$

Tabela 1: Valores experimentais dos coeficientes de extinção molar da oxi-Hb e meta-Hb determinados a pH 7,2, e nos comprimentos de ondas de 630 e 576 nm (Benesch et al., 1973).

3.3 – Determinação do pH da solução.

As medidas do pH das soluções foram realizadas utilizando um medidor de pH Corning pH/ion Analyzer 350, com eletrodo Ingold 405 – MS – 57/80. A calibração do aparelho se deu condicionando o eletrodo em solução de pH padrão (Ingold) 7, 4 e 9,2. Este condicionamento consiste em calibrar o eletrodo com as soluções padrão, alternando as seqüências de medida das mesmas, até que a resposta do eletrodo seja imediata a qualquer uma das soluções padrão utilizadas neste procedimento.

Todas as medidas de pH foram realizadas na temperatura pré-estabelecida para o experimento de oxigenação, evitando assim a variação do pK_a do tampão com a temperatura, $\Delta pK_a / ^\circ C$ e garantindo com isso o valor do pH (Mohan, 1995).

3.4 – Medidas de osmolalidades.

As osmolalidades das soluções contendo Hb (osm) foram determinadas por medidas de decaimento do ponto de congelamento da solução, usando um osmômetro Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.). Estas determinações se deram após a obtenção das curvas de oxigenação da Hb, para cada condição experimental. O logaritmo da atividade de água foi então calculado através da seguinte relação (Colombo et al., 1996):

$$\ln a_w = \frac{\Delta_{f_{pd}}}{K_f M_w} = \frac{-osm}{55,5} \quad (15)$$

onde $\Delta_{f_{pd}}$ é o decaimento do ponto de congelamento, $K_f = 1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$ é a constante crioscópica, e $M_w = 55,5$ é a molaridade da água pura e osm é o valor da osmolalidade da solução (Atkins, 1999, p.140).

3.5 – Determinação de curvas de oxigenação da Hb pelo método de Imai.

O método de Imai foi originalmente desenvolvido para proporcionar um meio mais preciso para estudar as propriedades funcionais de Hb, e tem sido aplicado com sucesso para muitas espécies desta proteína com a finalidade de revelar suas particularidades funcionais. O método de determinação automática das curvas de oxigenação de hemoproteínas combina a determinação polarimétrica da concentração de oxigênio (O_2) dissolvido em solução simultaneamente à determinação espectrofotométrica da saturação ($\bar{Y}$) da proteína por O_2 (Imai, 1981, 1982, 1994). Com estes dados é possível determinar as constantes de Adair e os

parâmetros de alguns modelos alostéricos (Adair, 1925; Monod et al., 1965).

A curva de equilíbrio de ligação de O_2 à Hb (C.E.O) é determinada pela interdependência entre a pO_2 (pressão de O_2) e a fração de saturação de O_2 ($\bar{Y}$) naquela pO_2 . Diversos métodos têm sido desenvolvidos para determinar esta curva. Em cada um destes métodos a atividade de O_2 dissolvido em solução é determinada diretamente ou então calculada. A saturação fracional de O_2 ($\bar{Y}$) é calculada a partir das variações espectrais que acompanham a combinação de O_2 à heme da Hb.

A construção da C.E.O pode ser feita por métodos classificados em duas categorias: Dinâmico e Estático. No primeiro, a pO_2 varia continuamente, mas em condições que se possa manter o equilíbrio da reação à qualquer momento. A pO_2 e $\bar{Y}$ são determinados simultaneamente o que possibilita a medida de uma curva contínua (Imai, 1982).

Por sua vez, no método estático, a variação da pO_2 não é contínua, a curva é determinada ponto a ponto, onde a pressão de oxigênio e a saturação são determinados constantemente e através dos vários pontos obtidos a curva é construída. Para exemplificar o método estático podemos citar a tonometria, que é uma técnica que consiste na utilização de um tonômetro, onde a solução de Hb é equilibrada com uma mistura de gases de pO_2 conhecida (Giardina & Amiconi, 1981).

Geralmente o método dinâmico tem as seguintes vantagens sobre o método estático: (a) a curva de equilíbrio contém muito mais informações do que uma reunião de pontos, especialmente quando a curva não é uma sigmoíde simples; (b) é mais preciso; (c) a aquisição, o processamento e a estocagem de dados são facilmente feitas; (d) a obtenção da curva realizada pelo método dinâmico nos permite acompanhar o curso do experimento através do teste visual da curva. Devido a estas vantagens o método

tonométrico clássico vem sendo gradualmente substituído por este método automático (Ackers, 1992).

3.6 – Descrição da cela espectropolarimétrica.

O sistema espectropolarimétrico de oxigenação da Hb desenvolvida em nosso laboratório (Caôn Filho, 1997) é constituído por uma cela de acrílico termostatzada, equipada com um eletrodo de oxigênio. Este aparato possui um caminho óptico de 12 mm, montada no compartimento para cela de um espectrofotômetro Varian Cary 3Bio UV – Visible que possui uma janela óptica que permite a passagem de luz pela cela, figura 3. A solução de Hb é agitada constantemente por um agitador magnético conectado a uma fonte Sincler SPS 2520 A, mantida a uma tensão constante de 3,5 V.

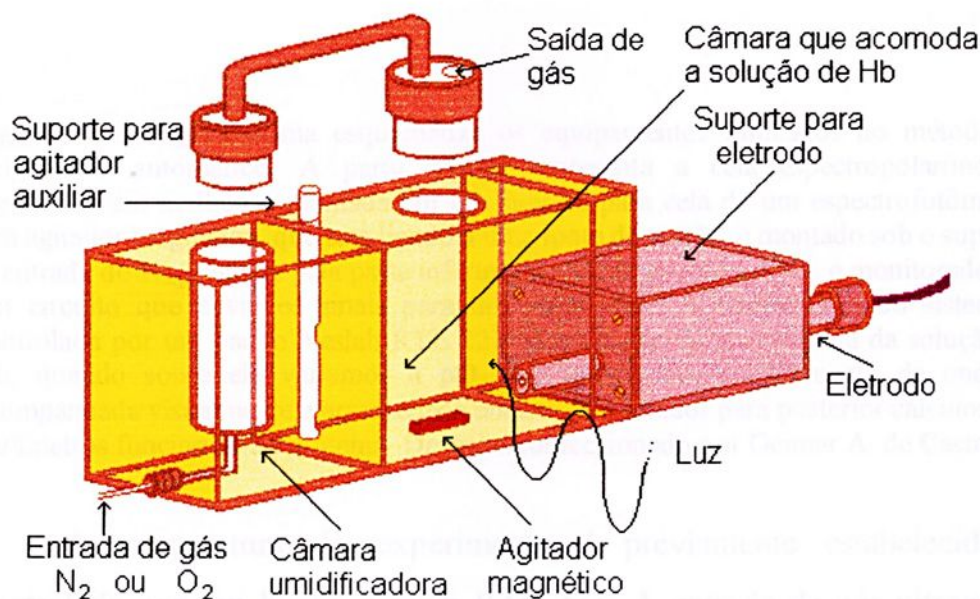


Figura 3: Esboço da cela desenvolvida em nosso laboratório e utilizada nos experimentos. A cela é composta por duas câmaras. A primeira contém algodão umedecido por onde os gases (N_2 e O_2) passam e por intermédio de um capilar que interliga as tampas, chegam a segunda câmara, onde encontra-se a solução de Hb. O desenho acima foi confeccionado por Ocimar A. de Castro.

A figura 4 mostra um esquema de toda a aparelhagem utilizada no sistema espectropolarimétrico, baseado no método de Imai, que foi montado em nosso laboratório (Caôn Filho, 1997).

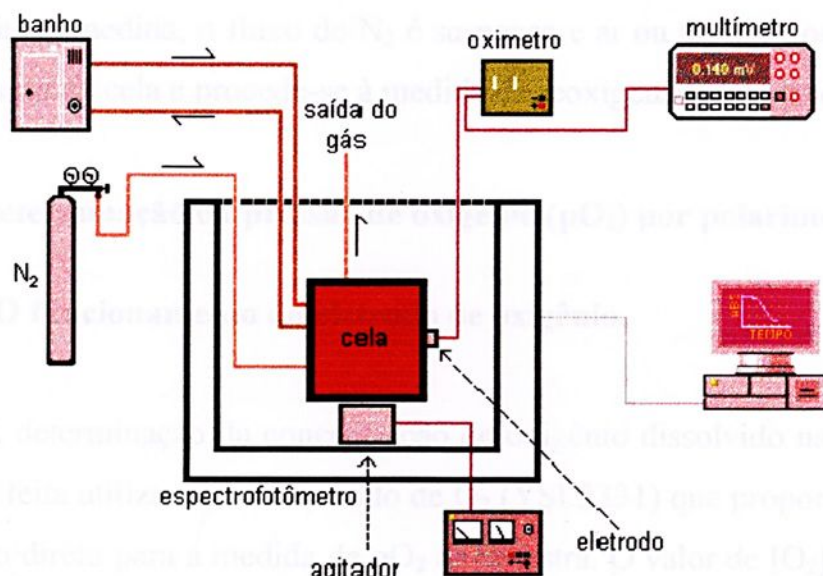


Figura 4: A figura acima esquematiza os equipamentos utilizados no método de oxigenação automático. A parte central representa a cela espectropolarimétrica construída em acrílico e montada em um suporte para cela de um espectrofotômetro. Um agitador magnético, que está ligado a uma fonte de tensão, é montado sob o suporte. A entrada do $N_{2(g)}$ ocorre pela parte inferior da cela. O eletrodo de O_2 é monitorado por um circuito que envia os sinais para um multímetro. A temperatura do sistema é controlada por um banho Neslab RTE 221. A mudança da absorbância da solução de Hb, quando sobre ela variamos a pO_2 , em apenas um comprimento de onda, é acompanhada visualmente e armazenada em um computador para posterior cálculos dos parâmetros funcionais da proteína. Desenho confeccionado por Ocimar A. de Castro.

A temperatura do experimento é previamente estabelecida e controlada por um banho Neslab RTE 221. A entrada de gás nitrogênio ocorre por intermédio de um capilar que está acoplado na região inferior da cela. O gás N_2 passa primeiro numa câmara umidificadora acoplada à própria cela. Em seguida, o gás atravessa um capilar que interliga as duas

câmaras, que compõe a cela e entra em contato com a solução. Um gradiente de pressão de O_2 entre a fase gasosa de N_2 e a solução é criado induzindo a desoxigenação da solução, que ocorre gradativamente com a liberação do oxigênio ligado a proteína. Após a completa desoxigenação da amostra, monitorada pela constância da voltagem do eletrodo e da absorbância medida, o fluxo de N_2 é suspenso e ar ou O_2 é introduzido na fase gasosa da cela e procede-se à medida de reoxigenação da amostra.

3.7 – Determinação da pressão de oxigênio (pO_2) por polarimetria.

3.7.1 - O funcionamento do eletrodo de oxigênio.

A determinação da concentração de oxigênio dissolvido na solução, $[O_2]$, é feita utilizando um eletrodo de O_2 (YSI 5331) que proporciona um caminho direto para a medida da pO_2 da amostra. O valor de $[O_2]_{\text{dissolvido}}$ é, para uma dada solução de composição designada, proporcional à atividade de oxigênio, medida pela pressão de O_2 na fase gasosa em equilíbrio com o oxigênio dissolvido naquela solução. Esta formulação da lei de Henry é expressa pela equação 3 (Atkins, 1999).

$$[O_2]_{\text{solução}} = pO_2 \cdot K_H$$

O eletrodo de O_2 é um sistema polarográfico completo que consiste de um cátodo de platina, um ânodo de prata e solução saturada de cloreto de potássio, que serve de meio para a corrente elétrica. A solução de KCl (3 M) é mantida por uma membrana de teflon fixada por “O-ring” de borracha. A membrana fina de teflon forma uma barreira mecânica e elétrica entre o eletrólito e a solução contendo o gás. Além da função de fixar a membrana ao eletrodo, o “O-ring” também é utilizado para vedar o encaixe do eletrodo na cela, garantindo assim o gradiente de pO_2 .

A velocidade de leitura do eletrodo de oxigênio depende da espessura da membrana, ou seja, a resposta é mais rápida com a membrana "High Sen's" (7230-R53(YSI 5776)) do que com a "Standart" (7230-R50(YSI 5775)). Quando uma voltagem polarizada (0,8 V) é aplicada entre o cátodo e o ânodo, o oxigênio existente sobre a membrana é reduzido, produzindo uma corrente elétrica.



onde E^0 é o potencial padrão de redução do oxigênio (Atkins, 1999)

Devido ao gradiente de oxigênio entre a fase da solução e o eletrodo, o O_2 difunde através da membrana em uma velocidade diretamente proporcional à concentração do gás dissolvido na solução. Com as condições de equilíbrio atingidas, a corrente gerada no eletrodo é proporcional à concentração de O_2 na solução. Este sinal de corrente é enviado à um medidor de oxigênio, contendo um circuito previamente montado em nosso laboratório, que converte a corrente gerada no eletrodo em voltagem ao longo da queda de potencial de um resistor. Este circuito está representado na figura 5:

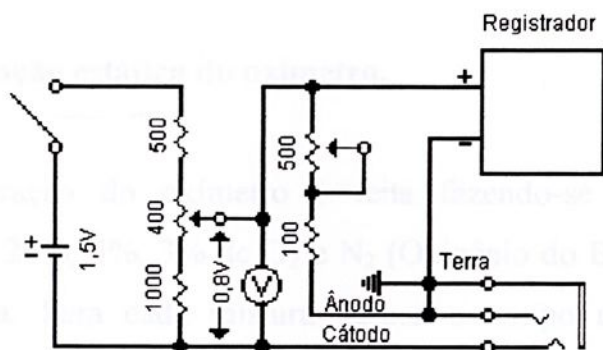


Figura 5: Circuito utilizado para polarizar o eletrodo com uma diferença de potencial (d.d.p.) de 0,8 V. Quanto maior for a concentração de O_2 na solução, menor é a resistência elétrica no circuito e vice-versa. Portanto a variação de O_2 é diretamente proporcional a variação de tensão a ser registrada ("Instructions for YSI 5331 Oxygen Probe"-YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio 45387 USA).

A tensão medida a todo instante é registrada por um multímetro Hewlett Packard 3440 A. Estes valores de tensão são posteriormente convertidos em valores de pO_2 utilizando a expressão de calibração do eletrodo:

$$pO_2 = p_T \cdot \left(\frac{v_i - v_{\min}}{v_{\max} - v_{\min}} \right) \quad (17)$$

onde, p_T é a pressão de oxigênio usada para calibrar o eletrodo. O seu valor é calculado a partir da pressão barométrica, P_b , da pressão de vapor de água, P_w , e da quantidade de oxigênio (%) na mistura gasosa, isto é, $P_T = (\%O_2 / 100) \times (P_b - P_w)$, (Wilhelm et al., 1977). Em 25 °C, a pressão de oxigênio vale 147,25 mmHg. $v_{\max}$ é a tensão correspondente à esta pressão; v_i é o valor da voltagem correspondente à uma determinada concentração de O_2 em uma solução qualquer; $v_{\min}$ é o valor mínimo de tensão correspondendo à voltagem observada na saída do eletrodo na ausência de O_2 (Jordan et al., 1956, Wilhelm et al., 1977, Imai, 1981).

3.7.2 - Calibração estática do oxímetro.

A calibração do oxímetro é feita fazendo-se passar gases de concentrações 20%, 5%, 3% de O_2 e N_2 (Oxigênio do Brasil S/A) na cela contendo água. Para cada mistura gasosa o tempo necessário para a estabilização da leitura do eletrodo foi de aproximadamente 20 minutos.

Após a obtenção da leitura da voltagem do eletrodo em equilíbrio com a mistura gasosa correspondente a 20% de O_2 é feita a passagem do N_2 para obter o valor de voltagem do eletrodo na ausência de O_2 . Estes dois pontos representam o máximo e mínimo de O_2 dissolvido na água,

respectivamente. A seguir a calibração é confirmada com as misturas de gases contendo 3 e 5% de oxigênio.

Os dados obtidos, apresentados na tabela 2 e na figura 6, mostram uma calibração típica do oxímetro.

Concentração de O ₂	Leitura do Oxímetro (mV)
0% de O ₂ (N ₂ puro)	0
3%	23,2
5%	37,7
20%	149,1

Tabela 2: Valores experimentais da calibração do oxímetro com nitrogênio puro e misturas gasosas de oxigênio em diferentes concentrações (3%, 5% e 20%).

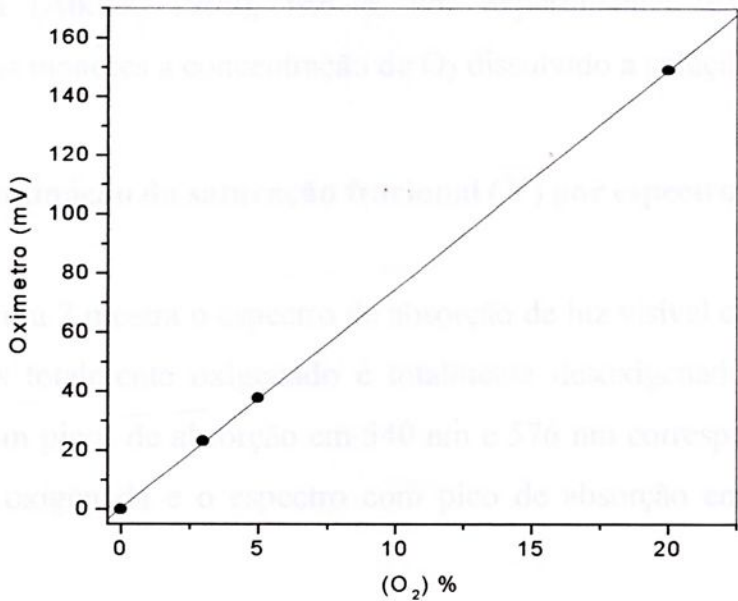


Figura 6: Curva de calibração do oxímetro com nitrogênio puro e misturas gasosas de oxigênio a 3, 5 e 20% de concentração. A correlação, para o ajuste feito nesta calibração, é igual a 0,9998.

A figura 6 mostra o gráfico da tensão do oxímetro para cada valor de concentração de O_2 . O alinhamento dos pontos experimentais demonstra que a resposta do eletrodo é linear com a concentração de O_2 dissolvido na água, confirmando assim a calibração do oxímetro (Imai, 1981, 1982).

3.7.3 - Calibração do oxímetro com a temperatura.

Nos experimentos onde as curvas de equilíbrio de oxigenação foram obtidas em diversas temperaturas a calibração do eletrodo de O_2 foi realizada na temperatura específica do ensaio. O eletrodo ficou em contato com a solução contendo a proteína, até que a leitura da voltagem tornasse estável (aproximadamente 20 minutos). Esta calibração se faz necessária pois a concentração do O_2 dissolvido na solução é dependente da temperatura (Atkins, 1999), isto é, nos experimentos realizados em temperaturas menores a concentração de O_2 dissolvido a solução é menor.

3.8 – Determinação da saturação fracional ($\bar{Y}$) por espectrofotometria.

A figura 7 mostra o espectro de absorção de luz visível característico dos estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb. O espectro com picos de absorção em 540 nm e 576 nm correspondem à Hb totalmente oxigenada e o espectro com pico de absorção em 550 nm à desoxi-Hb.

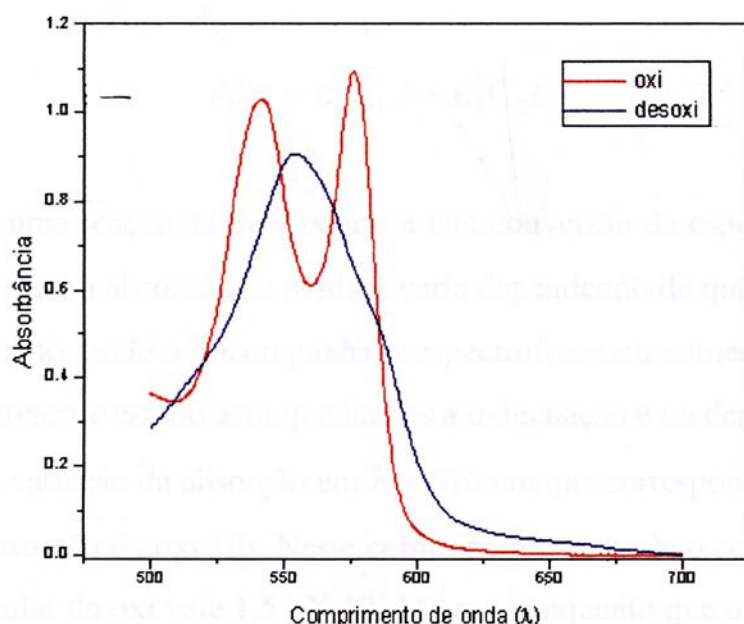


Figura 7: A figura acima mostra os espectros de absorção da desoxi-Hb (—) da oxi-Hb (—) na região do visível.

A absorbância de uma espécie cromófora é dada pela Lei de Beer-Lambert, ou seja,

$$\text{Abs} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon^\lambda \cdot \ell \cdot C \quad (18)$$

onde I_0 e I são as intensidades da luz incidente e emergente da amostra, respectivamente. C é a concentração molar da amostra, ℓ é o caminho óptico percorrido pela luz na amostra, em cm; ϵ^λ coeficiente de extinção molar do cromóforo, em $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, no comprimento de onda λ , e Abs é a absorbância anteriormente definida (Tinoco et al., 1995).

A absorbância de uma amostra no comprimento de onda λ contendo duas espécies cromóforas de coeficientes de extinção molar ϵ_1^λ e ϵ_2^λ e concentrações C_1 e C_2 , respectivamente, é dada por

$$\text{Abs} = \epsilon_1^\lambda C_1 \cdot \ell + \epsilon_2^\lambda C_2 \ell \quad (19)$$

Para uma reação na qual ocorre a interconversão da espécie 1 em 2, ou vice e versa, a absorbância medida varia dependendo de quão ϵ_1^λ difere de ϵ_2^λ , portanto, pode ser acompanhada espectrofotometricamente.

No presente estudo acompanhamos a oxigenação e ou desoxigenação da Hb pela variação da absorção em $\lambda = 576 \text{ nm}$ que corresponde à um dos picos da absorção da oxi-Hb. Neste comprimento de onda o coeficiente de extinção molar da oxi vale $1,53 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ enquanto que o da desoxi é igual a $0,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Riggs, 1981).

3.9 – Determinação dinâmica da curva de equilíbrio de oxigenação.

A variação da absorbância apresentada pela solução de Hb durante a desoxigenação/oxigenação esta exemplificada na figura 8. A construção desta curva é feita medindo-se simultaneamente a variação da absorbância (ΔAbs) e da voltagem do oxímetro enquanto um fluxo de N_2 ou O_2 é mantido sobre a superfície da solução. Os valores da $p\text{O}_2$, apresentados neste gráfico, foram calculados a partir dos valores de voltagem, utilizando a expressão 17.

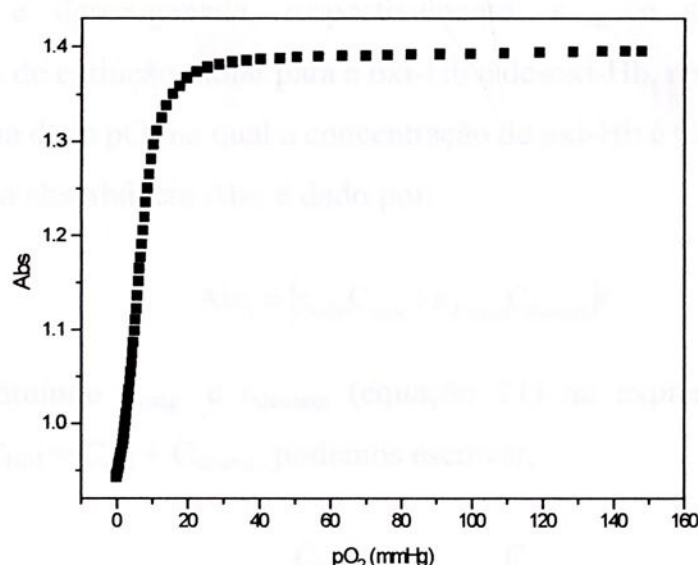


Figura 8: Curva de equilíbrio de oxigenação (C.E.O) da hemoglobina humana A₀ em solução contendo 60 μ M heme, 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 à 25 °C. Os pontos obtidos são referentes a etapa de desoxigenação. A absorbância foi medida em $\lambda = 576$ nm. A pO₂ no início do experimento vale 148 mmHg e quando a amostra estava totalmente desoxigenada o valor da pO₂ é zero mmHg.

A partir dos dados apresentados na figura 8 a fração de sítios ocupados ($\bar{Y}$), em cada valor de pO₂ é dada por,

$$\bar{Y} = \frac{[\text{oxi.Hb}]}{[\text{Hb}_{\text{total}}]} = \frac{[\text{oxi.Hb}]}{[\text{oxi.Hb}] + [\text{desoxi.Hb}]} \quad (20)$$

Como a hemoglobina apresenta duas espécies cromóforas, a oxi-Hb e a desoxi-Hb, se aplicarmos a lei de Beer-Lambert (equação 18) para cada espécie pura, teremos:

$$\text{Abs}_{\text{oxig}} = \epsilon_{\text{oxig}} \cdot C_{\text{HbT}} \cdot \ell \quad \text{e} \quad \text{Abs}_{\text{desoxig}} = \epsilon_{\text{desoxig}} \cdot C_{\text{HbT}} \cdot \ell \quad (21)$$

onde Abs_{oxi} e Abs_{desoxi} corresponde a absorbância da Hb totalmente oxigenada e desoxigenada, respectivamente, $\epsilon_{oxig.}$ e $\epsilon_{desoxig}$ são os coeficientes de extinção molar para a oxi-Hb e desoxi-Hb, respectivamente.

À uma dada pO_2 na qual a concentração de oxi-Hb é C_{oxi} e de desoxi-Hb, C_{desoxi} , a absorbância Abs_i é dado por:

$$Abs_i = (\epsilon_{oxig} C_{oxig} + \epsilon_{desoxig} C_{desoxig}) \ell \quad (22)$$

Substituindo $\epsilon_{oxig.}$ e $\epsilon_{desoxig}$ (equação 21) na expressão acima, e definindo $C_{HbT} = C_{oxi} + C_{desoxi}$, podemos escrever,

$$Abs_i = Abs_{oxig} \frac{C_{oxig}}{C_{HbT}} + Abs_{desoxig} \frac{C_{desoxig}}{C_{HbT}} \quad (23)$$

onde C_{HbT} é a concentração total da hemoglobina na solução.

Sabendo que $\frac{C_{oxig.}}{C_{HbT}} + \frac{C_{desoxig.}}{C_{HbT}} = 1$, a razão entre a concentração de Hb

oxigenada e a concentração total da Hb é igual a saturação, $\bar{Y} = \frac{C_{oxig.}}{C_{HbT}}$, e a

fração entre a concentração de Hb totalmente desoxigenada e a concentração total da Hb vale $1 - \bar{Y}$, podemos escrever a expressão 23 da seguinte maneira:

$$Abs_i = Abs_{oxig.} \bar{Y} + Abs_{desoxig.} (1 - \bar{Y}) \quad (24)$$

que rearranjada a partir das absorbâncias medidas chegamos à equação 25.

$$\bar{Y} = \frac{Abs_i - Abs_{desoxi}}{Abs_{oxi} - Abs_{desoxi}} \quad (25)$$

onde Abs_i é o valor da absorbância da amostra em uma dada pO_2 .

Os valores das absorvâncias para a solução desoxigenada (Abs_{desoxi} ou Abs_0) e oxigenada (Abs_{oxi} ou Abs_∞) são obtidos por extrapolações dos pontos iniciais e finais da curva de equilíbrio de ligação de O_2 . Assim é possível determinar com precisão os valores da saturação nos extremos da curva de equilíbrio de oxigenação. A Abs_{oxi} é obtido pela extrapolação do ajuste linear da porção superior do gráfico de Abs versus $1/pO_2$, quando a pO_2 tende ao “infinito”, $pO_2 \rightarrow \infty$ ($1/pO_2 \rightarrow 0$) (Imai, 1981, 1982, 1994).

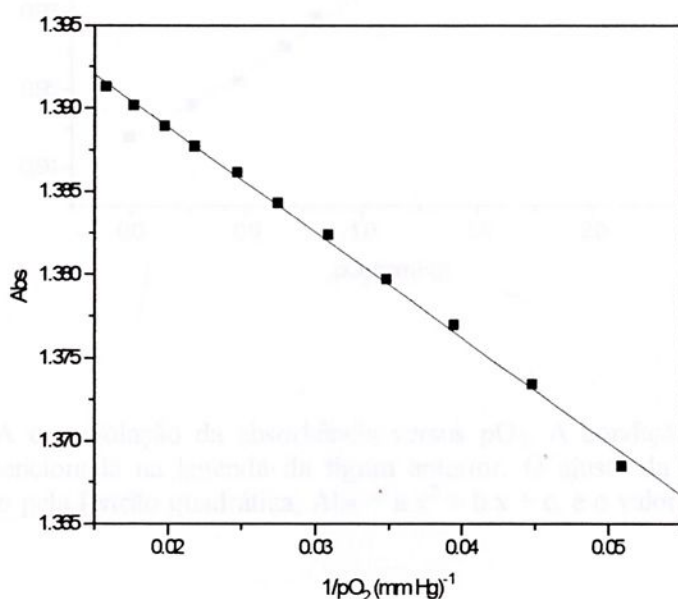


Figura 9: A figura acima mostra a extrapolação da absorvância contra $1/pO_2$, quando $1/pO_2 \rightarrow 0$. O experimento foi realizado em solução composta por 60 μM heme, 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 à 25 $^{\circ}C$. Os valores de absorvância foram medidos em 576 nm. O ajuste da porção superior da curva foi feito por regressão linear ($y = a + b.x$) e o valor obtido para a Abs_{oxi} foi de 1,3918.

Por sua vez, o valor de Abs_{desoxi} é obtido pela extrapolação do gráfico de Abs contra pO_2 , com $pO_2 \rightarrow 0$. Esta extrapolação é realizada pelo ajuste de uma função quadrática ($Abs = a.x^2 + b.x + c$) aplicada aos pontos experimentais que se encontram na região inicial da curva (Imai, 1990, 1994).

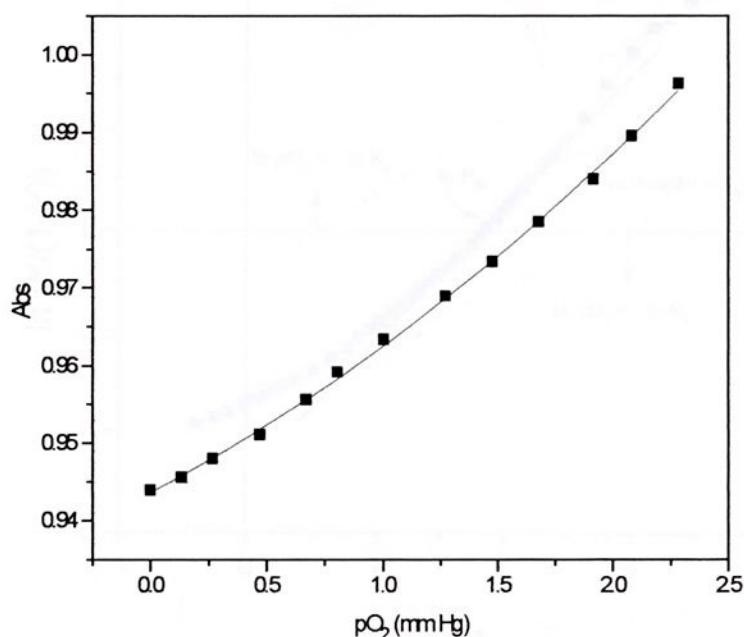


Figura 10: A extrapolação da absorbância versus pO_2 . A condição experimental é a mesma da mencionada na legenda da figura anterior. O ajuste da porção inferior da curva foi feito pela função quadrática, $Abs = a.x^2 + b.x + c$, e o valor da Abs_{desoxi} é igual a 0,9436.

Uma vez determinados os valores de Abs_{oxi} e Abs_{desoxi} , a curva de oxigenação, expressa em termos de Absorbância (Abs) versus pO_2 , é normalizada em termos da fração de sítios ocupados, $\bar{Y}$, conforme a eq. 25.

3.9.1 - O Gráfico de Hill.

Com dos valores de $\bar{Y}$ e pO_2 , o gráfico de Hill ($\ln(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\ln(pO_2)$), é construído, como mostra a figura 11.

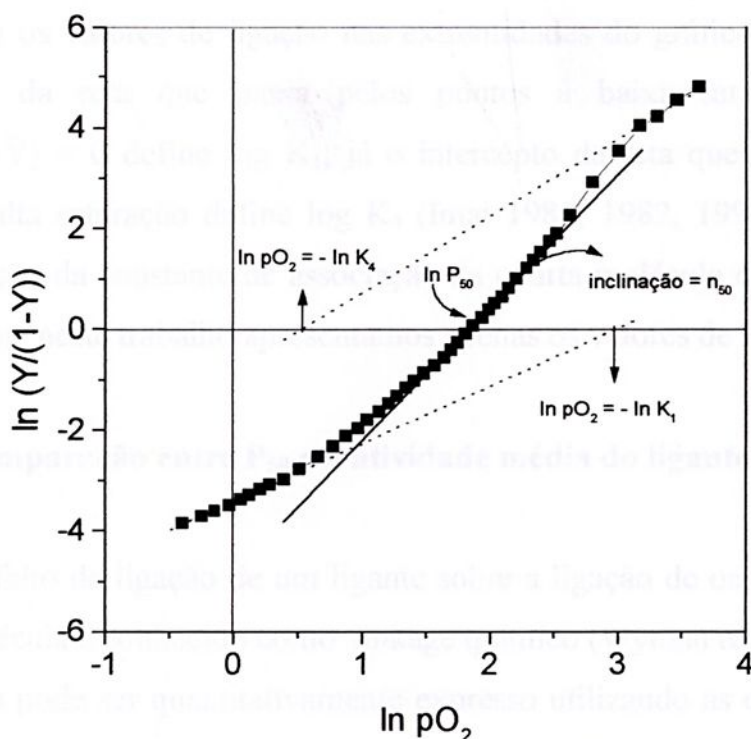


Figura 11: Gráfico de Hill para solução contendo Hb A_o (60 μM heme) nas condições de tamponamento anteriormente citada. Os pontos obtidos são referentes ao processo de desoxigenação. O valor da afinidade ($P_{50} = 6,48 \pm 0,32$ mm Hg) foi obtido da interseção deste gráfico com o eixo de $\ln pO_2$ e a cooperatividade ($n_{50} = 2,43 \pm 0,06$) foi calculada a partir da inclinação do mesmo. A extrapolação da reta que interpola a extremidade inferior do gráfico fornece o valor da constante de ligação da primeira molécula de O₂ à Hb ($K_1 = 0,048 \pm 0,002$ mm Hg⁻¹).

Do gráfico de Hill obtemos parâmetros funcionais da Hb, tais como a cooperatividade (n_{50}), descrita na introdução desta tese, a afinidade (P_{50}) e a constante de associação da primeiro ligante à proteína (K_1).

A afinidade da Hb por oxigênio (P_{50}) expressa o valor de pO_2 quando $\bar{Y} = 0,5$. Esta é a pressão correspondente a 50% dos sítios de ligação de O₂ saturados. O valor de P_{50} é obtido da intercessão do gráfico de $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ com o eixo de $\log pO_2$, quando $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) = 0$ (Baldwin, 1975; Imai, 1982).

Do gráfico de Hill é possível também determinarmos os valores das constantes de ligação da primeira e quarta molécula de O₂ à Hb, K_1 e K_4 ,

respectivamente. Estes valores são obtidos extrapolando as retas que interpolam os valores de ligação nas extremidades do gráfico de Hill. O intercepto da reta que passa pelos pontos à baixa saturação com $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) = 0$ define $\log K_1$; já o intercepto da reta que passa pelos pontos a alta saturação define $\log K_4$ (Imai 1981, 1982, 1994). Como a determinação da constante de associação da quarta molécula de O_2 à Hb, K_4 , é crítica, neste trabalho apresentamos apenas os valores de K_1 .

3.10 – Comparação entre P_{50} e a atividade média do ligante (P_m).

O efeito da ligação de um ligante sobre a ligação de outro ligante à macromolécula é conhecido como linkage químico (Wyman & Gill, 1990). Este efeito pode ser quantitativamente expresso utilizando as equações de linkage, originalmente propostas por Wyman em 1964.

A expressão 9 é um exemplo típico de equação de linkage utilizada na determinação do número diferencial de efetores heterotrópicos alostéricos, tais como: H^+ , ânions e água, que são liberados ou associados à Hb durante sua oxigenação (Wyman, 1964). Nesta equação utiliza-se o valor de P_{50} como uma aproximação do valor de P_m , a pressão de oxigênio correspondente à atividade média do ligante. A obtenção das curvas contínuas de oxigenação em diversas condições experimentais permitiu investigar a exatidão desta aproximação.

Wyman propôs estimar a energia livre de oxigenação da Hb (δG_{O_2}) calculando o trabalho para transferir δn_{O_2} moléculas de oxigênio do estado de referência, onde o potencial químico do ligante é $\mu_{O_2}^0$, para a proteína em meio no qual o potencial químico do ligante é μ_{O_2} , através da seguinte expressão:

$$\delta G_{O_2} = (\mu_{O_2} - \mu_{O_2}^0) \delta n_{O_2} = (RT \ln p_{O_2}) \delta n_{O_2} \quad (26)$$

Considerando um mol de Hb, o trabalho total de oxigenação ou a variação de energia livre total de oxigenação da proteína entre o seu estado totalmente insaturado e seu estado totalmente saturado, é dado pela integral:

$$\Delta G_{O_2} = G_{\text{oxi}} - G_{\text{desoxi}} = \int_0^4 RT \ln p_{O_2} \delta n_{O_2} = 4RT \ln P_m \quad (27)$$

Wyman demonstrou que o valor desta integral é diretamente proporcional ao logaritmo da atividade média do ligante ($\log P_m$). Comparando a equação 27 com a equação que fornece a energia livre de uma reação, $\Delta G = -R.T.\ln K$, chegamos a uma relação entre a atividade média do ligante (P_m) e constante de associação do ligante à proteína (K):

$$K = \frac{1}{P_m^4} \quad (28)$$

ou

$$P_m = K^{-1/4} \quad (29)$$

onde, a constante de equilíbrio de associação do ligante à proteína (K) é dada pelo produto das constantes de equilíbrio de associação, por passos, do ligante à proteína igualmente conhecida como constantes de Adair (Wyman & Gill, 1990), isto é, $K = k_1 k_2 k_3 k_4$.

Aplicando logaritmo em ambos os lados, chegamos em:

$$-\log K = 4 \log P_m \quad (30)$$

Para curvas de oxigenação simétricas em torno do valor de pO_2 onde a Hb encontra-se 50% oxigenada, P_m é igual numericamente a P_{50} . Um exemplo de como é possível obter P_m das curvas de oxigenação contínua é dado na figura 12. Nesta figura o valor da área hachurada vale $R.T.\ln P_m$.

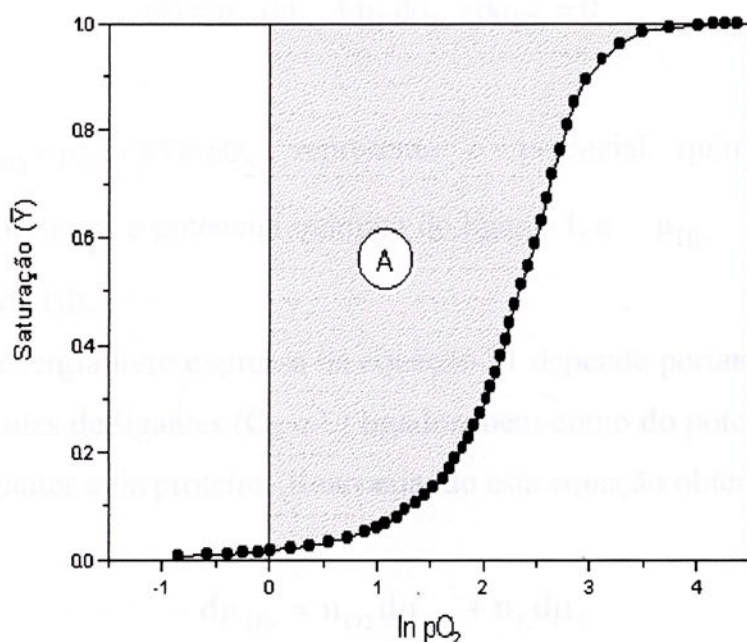


Figura 12: Curva de desoxigenação da Hb A₀ obtida de soluções contendo 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, 1,661 mOsm de sacarose, pH 7,3 à 25 °C. A atividade média do ligante (P_m) é definida pela área hachurada e para esta condição experimental vale 9,21 mm Hg.

3.11 - Equações de linkage.

Neste trabalho utilizamos as equações de linkage (Wyman, 1964, 1967; Wyman & Gill, 1990) para determinar o número diferencial de ligantes que são associados ou liberados pela hemoglobina durante sua oxigenação. A descrição de como esta metodologia foi aplicada aos nossos dados experimentais é comentada a seguir.

A associação de um ligante alostérico, L, à Hb pode ser descrita pela equação de Gibbs-Duhem. Consideremos que n_{O_2} moléculas de O_2 e n_L moléculas do ligante, L, estejam ligados a um mol de Hb, a temperatura e a pressão constantes. Para esta reação, no equilíbrio, a variação da energia livre total do sistema ($dG = 0$) é dada por:

$$dG = n_{O_2} d\mu_{O_2} + n_L d\mu_L + d\mu_{Hb} = 0 \quad (31)$$

onde $\mu_{O_2} = \mu_{O_2}^0 + RT \ln p_{O_2}$ representa o potencial químico do O_2 , $\mu_L = \mu_L^0 + RT \ln a_L$, o potencial químico do ligante L e μ_{Hb} o potencial químico da Hb.

A energia livre expressa na equação 31 depende portanto do número de moléculas de ligantes (O_2 e L) ligados, bem como do potencial químico destes ligantes e da proteína. Rearranjando esta equação obtemos:

$$-d\mu_{Hb} = n_{O_2} d\mu_{O_2} + n_L d\mu_L \quad (32)$$

que expressa a forma com que o potencial químico da Hb μ_{Hb} varia com a saturação e com a atividade dos ligantes, isto é:

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d \ln p_{O_2} + n_L d \ln a_L \quad (33)$$

Como, no equilíbrio, a ligação de O_2 e do ligante L à hemoglobina é um processo reversível, o potencial químico da proteína é uma propriedade de estado e $d\mu_{Hb}$ é uma diferencial exata, o que nos permite escrever a seguinte expressão de Maxwell (Colombo et al., 1992):

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_L} \right|_{pO_2} = \left. \frac{\partial n_L}{\partial \ln pO_2} \right|_{a_L} \quad (34)$$

A equação acima é uma das equações de linkage propostas por Wyman (Wyman, 1964). Esta expressão correlaciona a variação da saturação da Hb por O_2 , devido às mudanças em a_L sob pO_2 constante, com a variação na saturação da Hb por L devido a mudanças na pO_2 com a_L constante.

A partir da expressão 34 podemos derivar como a afinidade da hemoglobina por oxigênio, P_{50} , varia com a_L (Wyman, 1964; Wyman & Gill, 1990) e chegar a uma equação idêntica a expressão 9, isto é,

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{(n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}})}{4}$$

onde P_{50} tem o significado antes citado; a_L é a atividade do ligante L, a_i indica que a atividade de outros ligantes que não L, Δn_L é a diferença do número de moléculas de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb. Esta análise é correta apenas quando a atividade de um ligante varia e a atividade de qualquer outro ligante presente na solução é mantida constante (o que está indicado pelo subscrito a_i). Ao passo que, se o ligante alostérico L for a água, a relação de linkage é escrita como a equação 10.

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}}{4}$$

onde, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi (R) e desoxi (T_x) da Hb e a_i é a atividade de um ligante i , diferente da água.

A equação de linkage permite também determinar o número diferencial de prótons (Δn_{H^+}) ligados entre as conformações oxigenada ($n_{H^+}^{\text{oxi}}$) e desoxigenada ($n_{H^+}^{\text{desoxi}}$) da proteína (Wyman & Gill, 1990). Neste caso a equação será dada por:

$$-\left. \frac{d \log P_{50}}{d \text{pH}} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_{H^+}}{4} = \frac{(n_{H^+}^{\text{oxi}} - n_{H^+}^{\text{desoxi}})}{4} \quad (35)$$

A inclinação do gráfico de $\log P_{50}$ contra pH fornece o número de H^+ que são ligados/liberados na transição $T_x \rightleftharpoons R$ (Bucci & Frontecelli, 1981). A ligação de H^+ à Hb é notada devido ao aumento dos valores de P_{50} , a medida que os valores de pH diminuem. A partir deste comportamento o efeito Bohr pode ser quantificado aplicando à expressão 35 os valores dos parâmetros funcionais obtidos a partir das curvas de oxigenação em diferentes valores de pH.

O efeito da concentração de ânions (X^-) sobre a oxigenação da hemoglobina, também é quantificado utilizando o mesmo procedimento, como mostra a expressão a seguir:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_{X^-}} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_{X^-}}{4} = \frac{(n_{X^-}^{\text{oxi}} - n_{X^-}^{\text{desoxi}})}{4} \quad (36)$$

A inclinação do gráfico de $\ln P_{50}$ x $\ln [X]$ fornece a variação do número de moléculas de X^- que são liberadas/ligadas à Hb durante a sua oxigenação (Colombo et al., 1994).

3.12 - Equação de van't Hoff.

Com o desenvolvimento, em nosso laboratório, da cela espectropolarimétrica modificada (Caôn Filho, 1997), baseada na cela de Imai (Imai, 1982) foi possível realizarmos experimentos onde verificamos o comportamento da variação de hidratação associada a oxigenação da Hb em diversas concentrações de cloreto e diferentes temperaturas.

A análise do efeito da temperatura sobre a variação de oxigenação da hemoglobina, é realizada considerando a dependência da variação da energia livre de Gibbs (ΔG) de oxigenação com a temperatura (Wyman, 1964, 1967; Imai, 1982), isto é,

$$\Delta G = RT \ln P_{50} \quad (37)$$

onde, R é a constante universal dos gases ($R = 1,987 \text{ cal/K. mol}$) e T é a temperatura Kelvin (Atkins, 1999). Da segunda lei da termodinâmica a variação da energia livre de Gibbs é definida como:

$$\Delta G = \Delta H - T.\Delta S \quad (38)$$

tendo, ΔH e ΔS como a variação de entalpia e entropia da reação, respectivamente. Combinando as equações 37 e 38, obtemos a seguinte expressão:

$$\Delta H - T.\Delta S = RT \ln P_{50} \quad (39)$$



Que pode ser escrita como:

$$\ln P_{50} = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \quad (40)$$

Supondo que ΔH e ΔS são independentes da temperatura e derivando $\ln P_{50}$ em função de $1/T$, obtemos a equação de van't Hoff:

$$\left. \frac{\partial \ln P_{50}}{\partial (1/T)} \right|_{a_i} = \frac{\Delta H}{R} \quad (41)$$

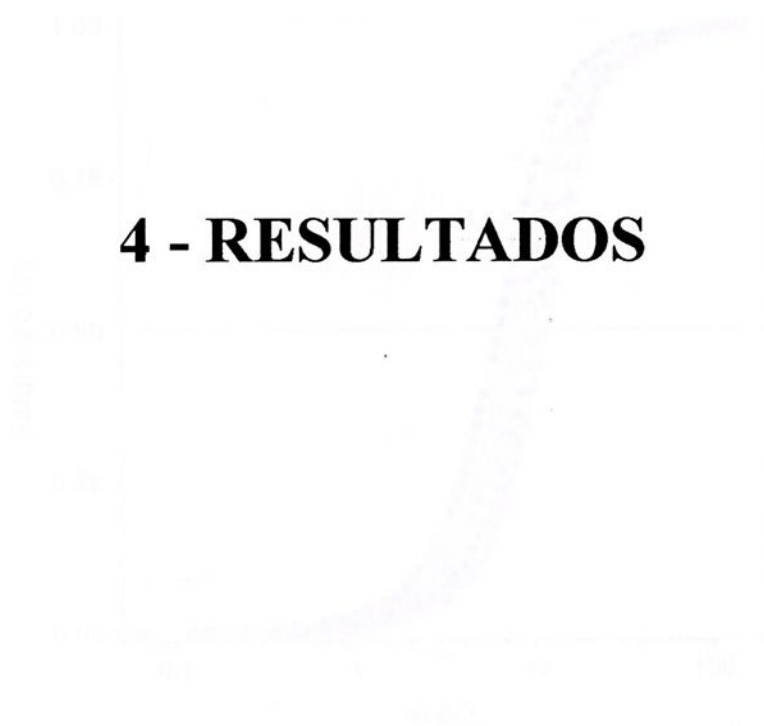
A inclinação do gráfico de $\ln P_{50}$ versus $1/T$, fornece o valor do calor de oxigenação por grupo heme, ΔH . Esta equação é usada para determinar a dependência da constante de equilíbrio de ligação de ligante à macromolécula com a temperatura, mantendo constante a atividade de qualquer outro ligante alostérico presente na solução (a_i). Os experimentos que determinam as constantes de associação de O_2 à Hb em diferentes temperaturas são extensivamente utilizadas para determinar o calor da reação, ΔH . A ferramenta utilizada nestas determinações é o gráfico de van't Hoff, $\ln P_{50}$ versus $1/T$ (Imai, 1982; Tinoco et al., 1995; van Holde et al., 1998; Atkins, 1999). A entropia da reação de oxigenação, ΔS , também pode ser estimada a partir da equação:

$$\Delta S = - \left(\frac{\Delta G - \Delta H}{T} \right) \quad (42)$$

Os gráficos de van't Hoff obtidos e apresentados neste estudo demonstraram que $\ln P_{50}$ varia linearmente com $1/T$, sugerindo assim que a variação da capacidade térmica (ΔC_p) da reação de oxigenação é próxima de zero.

4.1 - Efeito da atividade de água sobre a atividade de Hb por O_2

Quilicas da atividade de solutos neutros sobre a atividade de Hb por O_2 foi estudado com 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 em vasos com capacidade de 200 mL. A figura 13 mostra as curvas de saturação paralelas de Hb A, em função da pO_2 para cada condição experimental. Os pontos apresentados na figura correspondem às curvas obtidas utilizando o sistema computadorizado desenvolvido no Laboratório (Cabo Filho, 1977).



4 - RESULTADOS

Figura 13 - Curvas de saturação de Hb A por O_2 em solução tampão 10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,3 a 25°C em diferentes condições de força iônica: 100 mM (●), 200 mM (▲), 300 mM (○) e 400 mM (◐). As curvas de saturação de Hb A em função da pO_2 são paralelas.

4.1 - Efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb por O_2 .

O efeito da adição de solutos neutros sobre a afinidade da Hb A_0 , por O_2 , foi medido em 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 em várias concentrações de sacarose. A figura 13 mostra as curvas de saturação parcial da Hb A_0 em função de $\ln pO_2$ para cada condição experimental. Os pontos apresentados na figura em questão foram obtidos utilizando o sistema espectropolarimétrico desenvolvido em nosso laboratório (Caôn Filho, 1997).

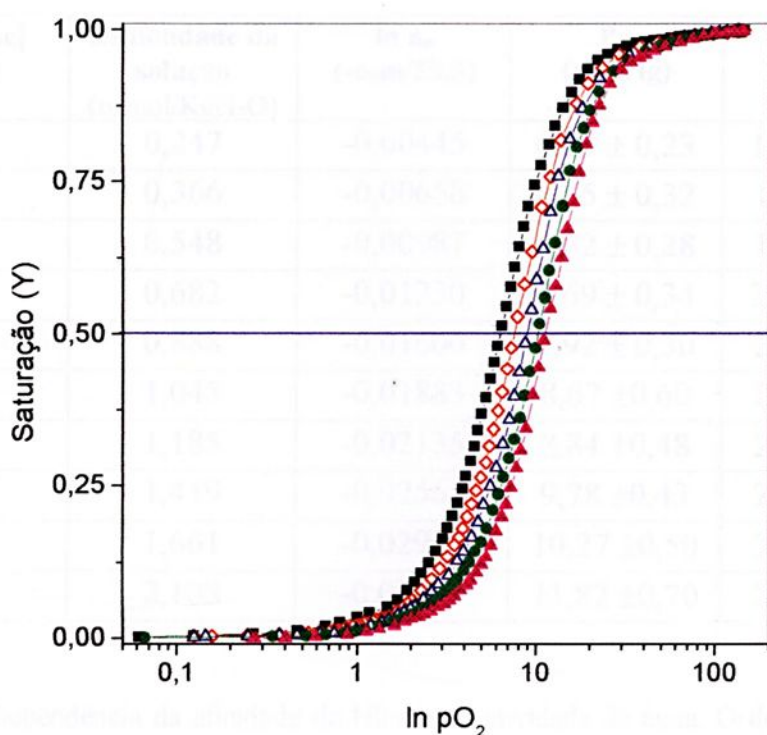


Figura 13: Comportamento da afinidade da Hb A_0 por O_2 em soluções contendo Hb (60 μ M heme), 10 mM de tampão Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,3, $T = 25^\circ\text{C}$ em diferentes atividades de água, ajustada sem (■) sacarose e com 0,50 (◇), 0,75 (△), 1,00 (●) e 1,35 (▲) molal desse soluto neutro. As curvas de saturação representam a etapa de desoxigenação da Hb.

A partir das curvas de oxigenação, obtidas para cada condição experimental, determinamos o comportamento da afinidade da Hb pelo ligante, P_{50} , para as diversas atividades de água (a_w) da solução, que fora ajustadas pela adição de soluto neutro. O aumento da concentração de sacarose desloca as curvas de oxigenação para a direita, indicando a diminuição da afinidade da Hb por O_2 , e conseqüente deslocamento do equilíbrio desoxi-Hb (T_X) $\rightleftharpoons$ oxi-Hb (R) na direção da estrutura menos hidratada, a T_X . Na tabela 3 apresentamos os valores numéricos que representam estes parâmetros.

[sacarose] Molal	Osmolidade da solução (osmol/KgH ₂ O)	ln a_w (-osm/55,5)	P_{50} (mm Hg)	ln P_{50}
0,0	0,247	-0,00445	6,29 ± 0,23	1,84 ± 0,04
0,15	0,366	-0,00658	6,55 ± 0,32	1,88 ± 0,06
0,35	0,548	-0,00987	6,82 ± 0,28	1,92 ± 0,05
0,50	0,682	-0,01230	7,69 ± 0,34	2,04 ± 0,04
0,65	0,888	-0,01600	7,92 ± 0,30	2,07 ± 0,05
0,75	1,045	-0,01883	8,67 ± 0,60	2,16 ± 0,06
0,90	1,185	-0,02135	8,84 ± 0,48	2,18 ± 0,05
1,00	1,419	-0,02561	9,78 ± 0,43	2,28 ± 0,05
1,20	1,661	-0,02993	10,27 ± 0,50	2,33 ± 0,05
1,35	2,108	-0,03799	11,82 ± 0,70	2,47 ± 0,05

Tabela 3: Dependência da afinidade da Hb com a atividade de água. O desvio padrão (Bevington & Robinson, 1992) é menor que 5%, tanto para os valores de ln P_{50} como para os valores de P_{50} .

O comportamento de ln P_{50} em função de ln a_w , é mostrado na figura a seguir.

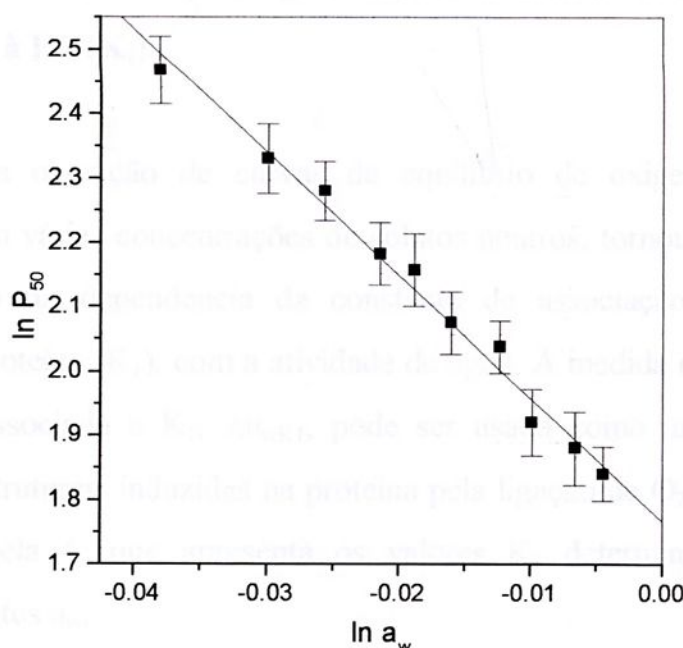


Figura 14: Gráfico de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ obtido em soluções contendo Hb em uma concentração de 60 μM heme, 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 à 25°C. As osmolalidades das soluções foram ajustadas com a adição de sacarose e variaram de 0,247 a 2,108 Osmoles/Kg H_2O . Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de P_{50} sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra, o P_{50} foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação.

O gráfico da figura 14 mostra que o $\ln P_{50}$ varia linearmente com a variação em $\ln a_w$, comportamento este que concorda com os resultados anteriormente publicados (Colombo et al., 1992, 1994, 1996; Parsegian et al., 1995). De acordo com a equação de linkage de Wyman (eq. 10) a inclinação $d(\ln P_{50})/d(\ln a_w)$ fornece o número aparente de moléculas de água envolvidas durante a transição T_X para R. Para as condições experimentais apresentadas na figura anterior o Δn_w corresponde a 72 ± 3 moléculas de água, por tetrâmero de hemoglobina.

4.2 - Efeito da atividade de água sobre a constante de associação do primeiro O₂ à Hb (K₁).

Com a obtenção de curvas de equilíbrio de oxigenação da Hb contínuas, em várias concentrações de solutos neutros, tornou-se possível a determinação da dependência da constante de associação do primeiro oxigênio à proteína (K₁), com a atividade de água. A medida da variação de hidratação associada a K₁, Δn_{wK_1} , pode ser usada como uma sonda das mudanças estruturais induzidas na proteína pela ligação de O₂. Este efeito é visto na tabela 4, que apresenta os valores K₁ determinados para as correspondentes a_w.

[sacarose] Molal	Osmolidade da solução (osmol/KgH ₂ O)	ln a _w (-osm/55,5)	ln K ₁	K ₁ (mmHg) ⁻¹
0,0	0,247	-0,00445	-3,03 ± 0,03	0,048 ± 0,002
0,15	0,366	-0,00658	-3,12 ± 0,07	0,044 ± 0,003
0,35	0,548	-0,00987	-3,29 ± 0,05	0,037 ± 0,001
0,50	0,682	-0,01230	-3,56 ± 0,02	0,028 ± 0,002
0,65	0,888	-0,01600	-3,62 ± 0,1	0,027 ± 0,003
0,75	1,045	-0,01883	-3,83 ± 0,03	0,022 ± 0,001
1,00	1,419	-0,02561	-4,18 ± 0,03	0,015 ± 0,001
1,20	1,661	-0,02993	-4,26 ± 0,03	0,014 ± 0,002

Tabela 4: Dependência de ln K₁ com a da atividade de água. O desvio padrão (Bevington & Robinson, 1992) é menor que 10%, tanto para os valores de ln K₁ como para os valores de K₁.

A figura 15 mostra o comportamento de ln K₁ em função de ln a_w.

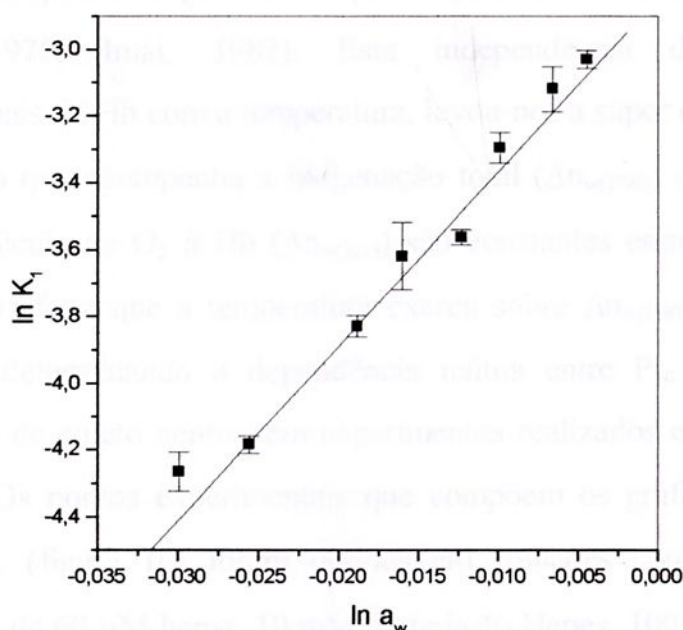


Figura 15: Os pontos que compõe o gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ foram obtidos nas condições experimentais descritas na figura 14. O Δn_w corresponde a 52 ± 2 moléculas de água, que estão associadas a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb.

A exemplo da equação de linkage entre $\ln P_{50}$ e $\ln a_w$, a dependência de $\ln K_1$ com $\ln a_w$ fornece a variação de hidratação que acompanha a ligação do primeiro oxigênio à Hb, conforme a equação a seguir:

$$\left. \frac{\partial \ln K_1}{\partial \ln a_w} \right|_{ai} = \Delta n_{wK1} \quad (43)$$

A inclinação do gráfico da figura 15 estabelece que 52 ± 2 moléculas de água ligam-se ao tetrâmero de Hb com a ligação da 1ª molécula de O_2 .

4.3 – Efeito da temperatura sobre $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$.

É descrito na literatura que as conformações da desoxi-Hb e da oxi-Hb não sofrem alterações nas suas respectivas estruturas, dentro de uma

variação de temperatura que vai de aproximadamente 10 à 40 °C (Imai & Yonetani, 1975; Imai, 1982). Esta independência dos extremos conformacionais da Hb com a temperatura, levou-nos a supor que a variação de hidratação que acompanha a oxigenação total ($\Delta n_{w(P50)}$) e a ligação da primeira molécula de O₂ à Hb ($\Delta n_{w(K1)}$) são constantes entre 15 e 35 °C. Para tanto, o efeito que a temperatura exerce sobre $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ foi investigado, determinando a dependência mútua entre P₅₀ e K₁ com a concentração de soluto neutro, em experimentos realizados em 15, 20, 25, 30 e 35 °C. Os pontos experimentais que compõem os gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ (figura 16) foram obtidos em soluções contendo Hb em concentração de 60 μ M heme, 10 mM de tampão Hepes, 100 mM de NaCl, pH 7,3 em diferentes concentrações de sacarose e na variação de temperatura anteriormente mencionada.

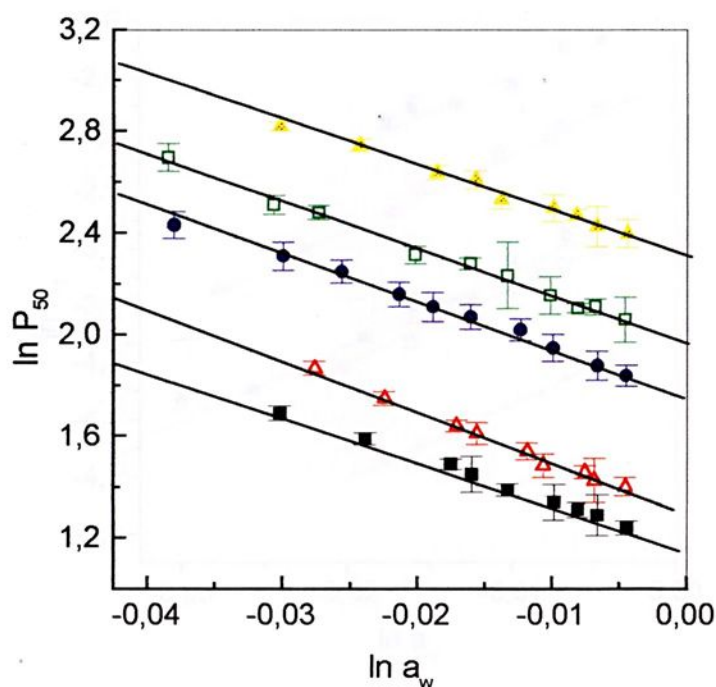


Figura 16: Comportamento da afinidade da Hb A₀ em função da $\ln a_w$. Os pontos experimentais foram obtidos nas condições experimentais citadas no texto em 35 (▲), 30 (□), 25 (●), 20 (△) e 15 °C (■).

Na figura 16 mostra que $\ln P_{50}$ varia linearmente com a variação de $\ln a_w$ e que o aumento da temperatura diminui a afinidade da Hb por oxigênio, ou seja, o valor de P_{50} aumenta, indicando que a estrutura da desoxi-Hb é estabilizada em temperaturas mais altas. Este resultado evidencia também que a ligação de O_2 à Hb é exotérmica (Benesch et al., 1969; Imai, 1982; Razynska et al., 1990; Bucci et al., 1991; Jonhson et al., 1992). A inclinação do ajuste linear aplicado aos pontos experimentais fornece o número diferencial de moléculas de água que estão associadas a transição $T_X \rightarrow R$. O paralelismo apresentado pelos ajustes dos gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$, demonstra que dentro do erro experimental $\Delta n_{w(P50)}$ independe da temperatura. Comportamento idêntico é mostrado na figura 17, onde gráficos de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ foram determinados nas mesmas condições experimentais.

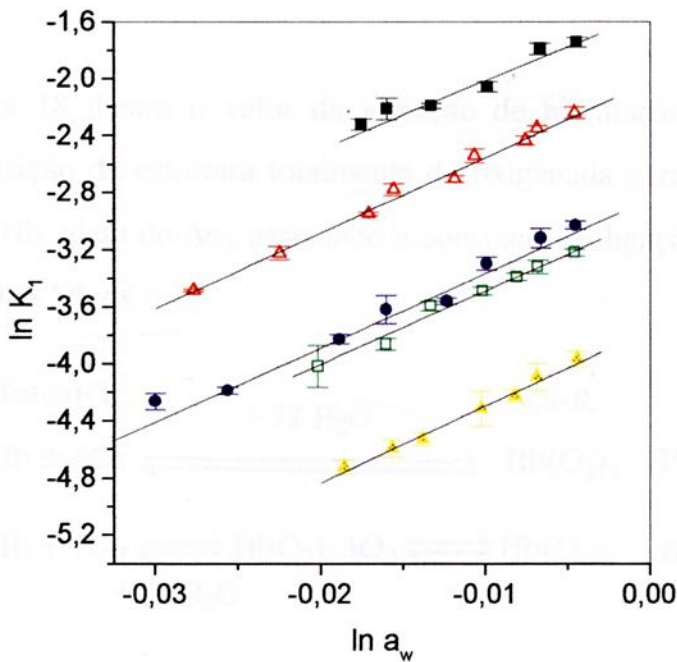


Figura: 17: Comportamento de $\ln K_1$ em função de $\ln a_w$. Os pontos representam os valores de K_1 obtidos em 15 (■), 20 (△), 25 (●), 30 (□), e 35 °C (▲).

Os valores das variações de hidratação associados a transição $T_X \rightarrow R$ ($\Delta n_{w(P50)}$) e à K_1 ($\Delta n_{w(K1)}$) foram determinados para a cada temperatura e são mostrados na tabela 5. Nota-se que tanto $\Delta n_{w(P50)}$ quanto $\Delta n_{w(K1)}$, dentro de um erro experimental, são independentes da temperatura.

Temperatura ($^{\circ}C$)	$\Delta n_{w(P50)}$	$\Delta n_{w(K1)}$
15	71 ± 2	48 ± 2
20	80 ± 2	53 ± 1
25	72 ± 3	52 ± 2
30	74 ± 3	51 ± 3
35	70 ± 3	54 ± 2
Média de Δn_w	73 ± 3	52 ± 2

Tabela 5: A tabela acima mostra o número de moléculas de água ligadas durante a transição $T_x \rightarrow R$ ($\Delta n_{w(P50)}$) e durante a ligação da primeira molécula de oxigênio à proteína ($\Delta n_{w(K1)}$) em experimentos realizados em diferentes temperaturas. A média de moléculas de água (Δn_w médio) ligadas neste dois casos foi de 73 ± 3 e 52 ± 2 . As diferenças apresentadas entre cada Δn_w estão diretamente relacionadas a erros experimentais.

A figura 18 ilustra o valor da variação de hidratação determinada durante a transição da estrutura totalmente desoxigenada para a totalmente oxigenada da Hb, além do Δn_w associado a constante de ligação da primeira molécula de O_2 à Hb (K_1).

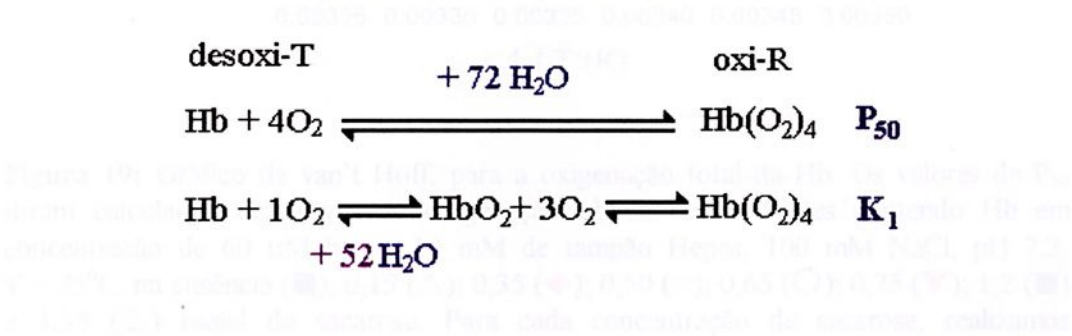


Figura 18: Variações de hidratação associadas a oxigenação total e a constante de ligação da primeira molécula de O_2 à Hb (K_1).

4.4 - Comportamento do calor de oxigenação total (ΔH_{P50}) e da ligação da primeira molécula de O_2 (ΔH_{K1}) em função de a_w .

Utilizando o conjunto de dados experimentais, apresentados nas figuras 16 e 17, podemos determinar a entalpia e entropia de oxigenação, relacionando o $\ln P_{50}$ e o $\ln K_1$ com o inverso da temperatura, gráfico de van't Hoff. A figura 19 mostra os gráficos de $\ln P_{50}$ versus $1/T$, determinados em diversas atividades de água (a_w).

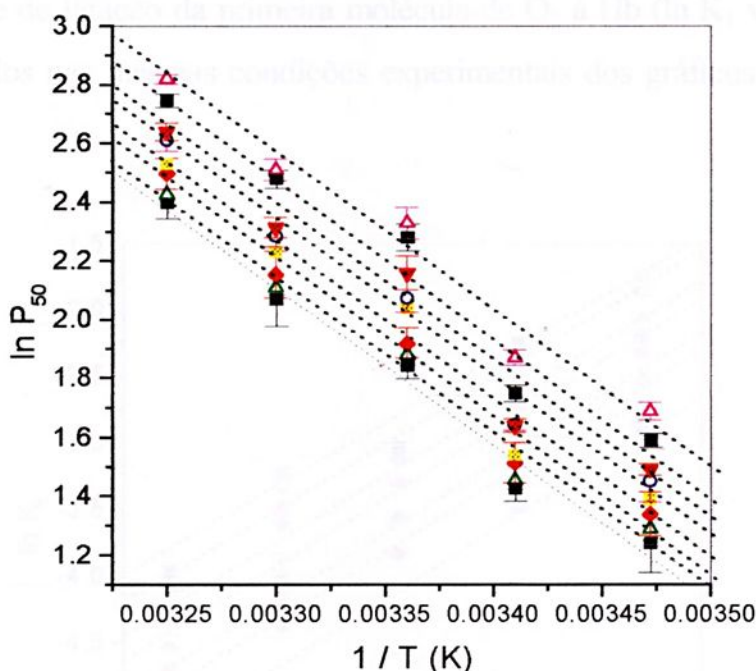


Figura 19: Gráfico de van't Hoff, para a oxigenação total da Hb. Os valores de P_{50} foram calculados de curvas de oxigenação obtidas em soluções contendo Hb em concentração de 60 μM heme, 10 mM de tampão Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,3, $T = 25^\circ\text{C}$, na ausência (■); 0,15 (△); 0,35 (◆); 0,50 (■); 0,65 (○); 0,75 (▼); 1,2 (■) e 1,35 (△) molal de sacarose. Para cada concentração de sacarose, realizamos experimentos em 15, 20, 25, 30 e 35°C . O ajuste foi feito de acordo com a equação van't Hoff, equação 41, e a inclinação $(\Delta H^\circ/R)$ fornece o valor do calor de oxigenação por grupo heme de Hb.

As linhas contínuas, mostradas na figura anterior, representam o melhor ajuste da equação de linkage baseada na expressão de van't Hoff (eq. 41), isto é,

$$\left. \frac{\partial \ln P_{50}}{\partial (1/T)} \right|_{a_w} = \frac{\Delta H^0}{R}$$

onde $\Delta H^0/R$ representa o valor do calor de oxigenação por grupo heme da proteína, medidos em atividades de água (a_w) fixa e temperatura variável.

Por sua vez, a figura 20 apresenta os gráficos de van't Hoff referentes a constante de ligação da primeira molécula de O_2 à Hb ($\ln K_1$ versus $1/T$), determinados nas mesmas condições experimentais dos gráficos obtidos na figura 19.

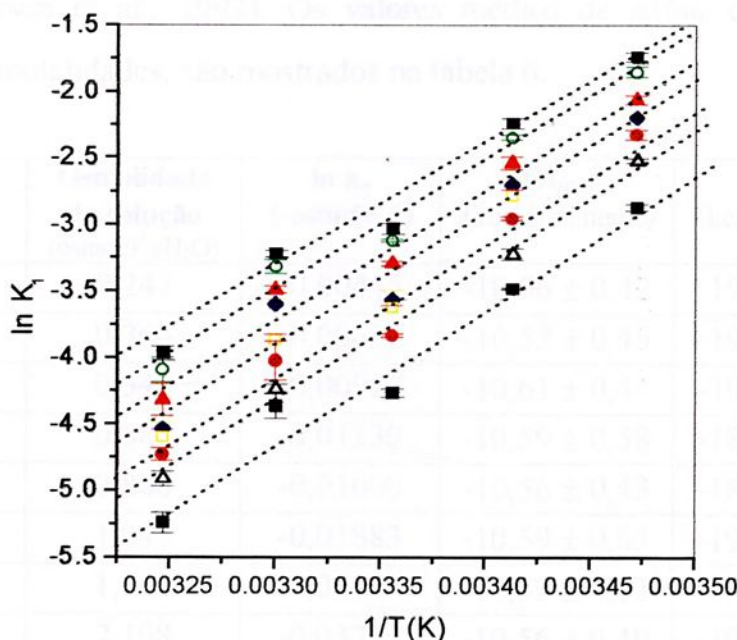


Figura 20: O Gráfico de van't Hoff acima, mostra a dependência de K_1 com o inverso da temperatura. Os valores de K_1 foram calculados de curvas de oxigenação obtidas nas condições experimentais descritas na legenda da fig. 18. O ajuste foi feito de acordo com a equação (44) e a inclinação fornece o valor do calor de ligação da primeira molécula de O_2 à Hb A_0 .

Os ajustes mostrados na figura 20 obedecem à equação:

$$\left. \frac{\partial \ln K_1}{\partial (1/T)} \right|_{a_w} = - \frac{\Delta H^0}{R} \tag{44}$$

sendo que a inclinação, $\Delta H^0/R$, quantifica o valor do calor de ligação da 1ª molécula de O₂ à Hb A₀ medidos em atividades de água fixas e temperaturas variáveis.

As variações de entalpia que acompanham a oxigenação total ($\Delta H_{(P50)} = -10,57 \pm 0,50$ kcal/mol.heme, isto é, $-42,30 \pm 2,00$ kcal/mol.Hb) e K₁ ($\Delta H_{(K1)} = -19,12 \pm 0,80$ kcal/mol.O₂) estão em concordância com os resultados anteriormente descritos, para solução experimental de semelhante composição química (Benesch et al., 1969; Imai, 1979, 1982; Bucci et al., 1991; Johnson et al., 1992). Os valores médios de ΔH_{P50} e ΔH_{K1} , nas diversas osmolalidades, são mostrados na tabela 6.

[sacarose] Molal	Osmolidade da solução (osmol/KgH ₂ O)	ln a _w (-osm/55,5)	ΔH _(P50) (kcal/mol.heme)	ΔH _(K1) (kcal/mol de O ₂)
0,0	0,247	-0,00445	-10,56 ± 0,42	-19,14 ± 0,84
0,15	0,366	-0,00658	-10,53 ± 0,45	-19,20 ± 0,83
0,35	0,548	-0,00987	-10,61 ± 0,41	-19,23 ± 0,89
0,50	0,682	-0,01230	-10,59 ± 0,58	-18,77 ± 0,88
0,65	0,888	-0,01600	-10,56 ± 0,43	-18,81 ± 0,25
0,75	1,045	-0,01883	-10,59 ± 0,63	-19,79 ± 0,90
1,20	1,661	-0,02993	-10,53 ± 0,62	-19,01 ± 0,82
1,35	2,108	-0,03799	-10,56 ± 0,49	-19,04 ± 0,99
Média de ΔH			-10,57 ± 0,50	-19,12 ± 0,80

Tabela 6: Variação de entalpia de oxigenação obtida durante a transição T_X→R ($\Delta H_{(P50)}$) e durante a ligação da 1ª molécula de O₂ à proteína ($\Delta H_{(K1)}$). O desvio padrão (Bevington & Robinson, 1992) para os valores de $\Delta H_{(P50)}$ e $\Delta H_{(K1)}$ são menores que 6%.

A figura 21 ilustra os valores das variações de entalpia determinada durante a oxigenação total e a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb.

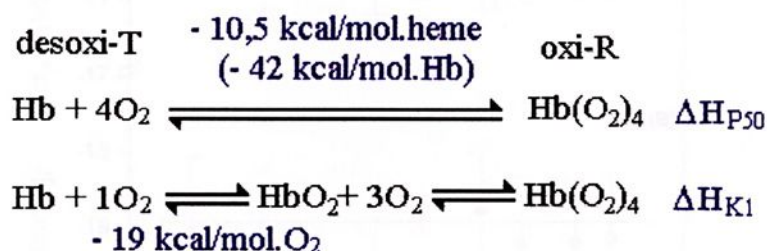


Figura 21: Variações de entalpia associadas a oxigenação total e a K_1 .

Dentro do intervalo limitado de variação de a_w e de temperatura, os dados os gráficos de ΔH versus $R.T.\ln a_w$ (figura 22) demonstram que a variação de entalpia de oxigenação total e para K_1 são independentes tanto da atividade de água quanto da temperatura. A independência de ΔH de oxigenação com a temperatura indica que a variação da capacidade térmica (ΔC_p) associada à reação de oxigenação é próxima de zero e que as estruturas da oxi e desoxi-Hb, no intervalo de temperatura investigado, são invariantes. Este resultado é consistente com aqueles observados por outros autores (Imai & Yonetani, 1975; Imai, 1982). Por sua vez, o fato da variação de entalpia de oxigenação total e para a ligação do primeiro O_2 serem independentes da concentração do soluto, evidencia a ausência da interação direta entre a proteína e a sacarose.

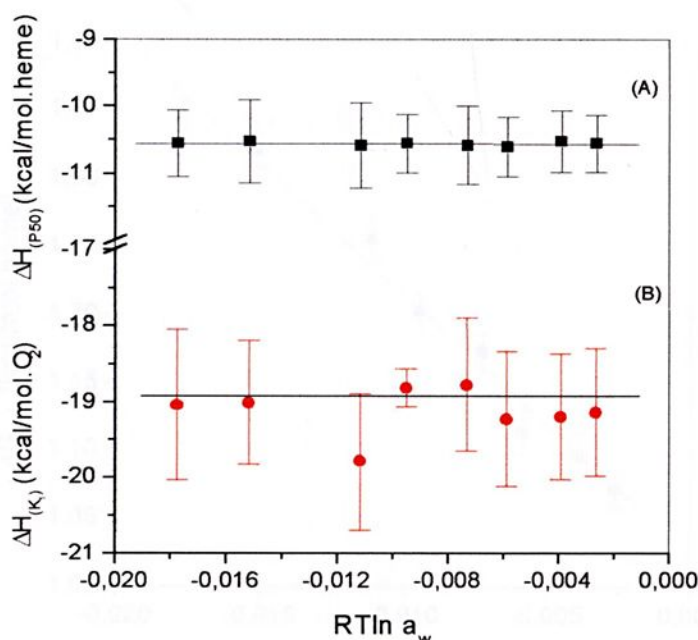


Figura 22: Dependência da variação de entalpia de oxigenação total (A) e da variação de entalpia de ligação do primeiro O_2 (B) a Hb A_0 . A linha contínua representa o ajuste linear que fornece um $\Delta H_{p50} = -10,57 \pm 0,50$ kcal/mol.heme e $\Delta H_{K1} = -19,0 \pm 1,60$ kcal/mol. O_2 .

Sabendo que $\Delta G = 4R.T.\ln P_{50}$ e $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, os valores de ΔG e ΔS de oxigenação foram calculados, tanto para P_{50} como para K_1 , e a dependência dessas grandezas com a atividade de água são mostradas nas figuras 23a e 23b. A inclinação do gráfico de $\Delta G_{(p50)} \times RT \ln a_w$ (fig. 23a) corresponde a um Δn_w de 74 ± 4 , que representa o número de moléculas de água que se ligam à Hb durante a transição $T_X \leftrightarrow R$, por sua vez, um Δn_w de 52 ± 3 correspondente a inclinação do gráfico de $\Delta G_{(K1)} \times RT \ln a_w$ (fig. 23b), representa o número de moléculas de água que associam à Hb durante a ligação do primeiro O_2 .

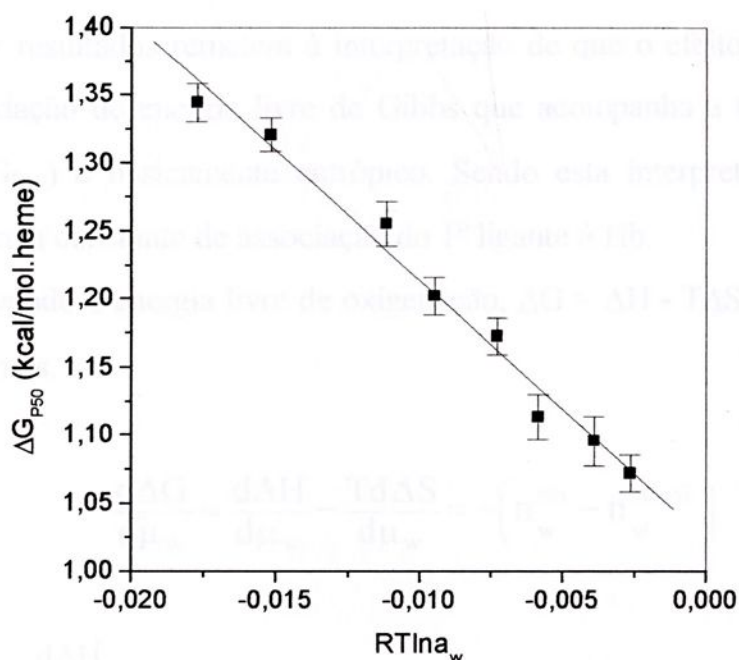


Figura 23(a): Comportamento de $\Delta G_{(p50)}$ de oxigenação total em diferentes atividades de água. A inclinação do gráfico de $\Delta G_{(p50)} \times RT \ln a_w$ corresponde a um Δn_w de 74 ± 4 moléculas de água.

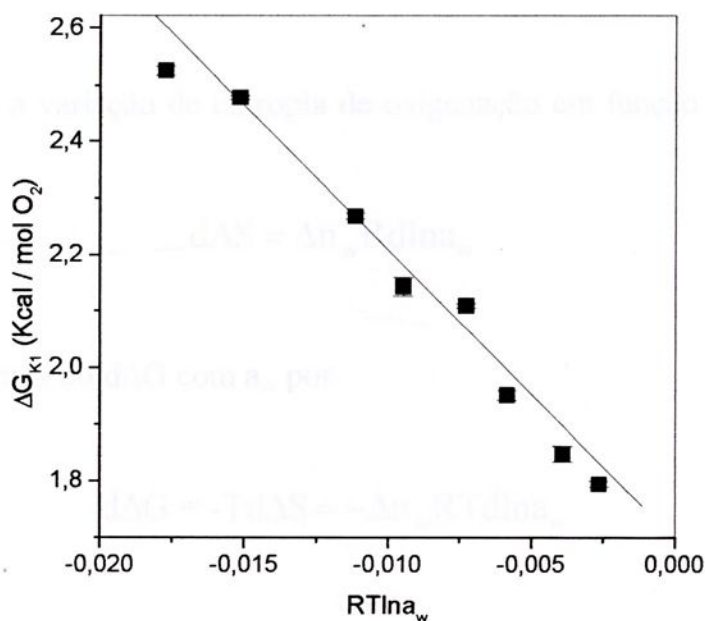


Figura 23(b): Comportamento de $\Delta G_{(K1)}$ em diferentes atividades de água. A inclinação do gráfico de $\Delta G_{(K1)} \times RT \ln a_w$ fornece um $\Delta n_w = 52 \pm 3$ moléculas de água.

Estes resultados remetem à interpretação de que o efeito de $\Delta n_{w(P50)}$ sobre a variação de energia livre de Gibbs que acompanha a transição de $T_X \rightarrow R$ (ΔG_{P50}) é basicamente entrópico. Sendo esta interpretação válida também para a constante de associação do 1º ligante à Hb.

Derivando a energia livre de oxigenação, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em função de $d\mu_w$ ², temos.

$$\frac{d\Delta G}{d\mu_w} = \frac{d\Delta H}{d\mu_w} - \frac{Td\Delta S}{d\mu_w} = -\left(n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}\right) \quad (45)$$

Como, $\frac{d\Delta H}{d\mu_w} = 0$, tem-se que:

$$d\Delta S = d(S_{\text{oxi}} - S_{\text{desoxi}}) = \left(n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}\right) R d\ln a_w \quad (46)$$

Logo, a variação de entropia de oxigenação em função da a_w é dada por:

$$d\Delta S = \Delta n_w R d\ln a_w \quad (47)$$

e a dependência do $d\Delta G$ com a_w por

$$d\Delta G = -Td\Delta S = -\Delta n_w RT d\ln a_w \quad (48)$$

² O potencial químico da água é dado por: $\mu_w = \mu_w^0 + RT\ln a_w$ e sua derivada: $d\mu_w = RT d\ln a_w$

4.5 – Influência da concentração de NaCl sobre o Δn_w .

Recentemente, Colombo e Seixas (1999) demonstraram que a variação de hidratação que acompanha a oxigenação da Hb (Δn_w) é dependente da concentração de ânions. Estes autores propuseram que a estrutura da desoxi-Hb é estabilizada em um terceiro estado conformacional em soluções tampão com ausência de sais (Colombo & Seixas, 1999). Dado a relevância dos resultados apresentados por Seixas e Colombo, sobre o contexto do presente trabalho, novas determinações da influência da atividade de água sobre a afinidade (P_{50}) da Hb por O_2 , foram realizadas. A figura 24 representa o gráfico de $\ln (P_{50}/P_{50}^0)$ versus $\ln a_w$, medido em 10 mM de tampão Hepes, pH 7,3, em diversas concentrações de NaCl e atividades de água ajustadas pela adição de sacarose.

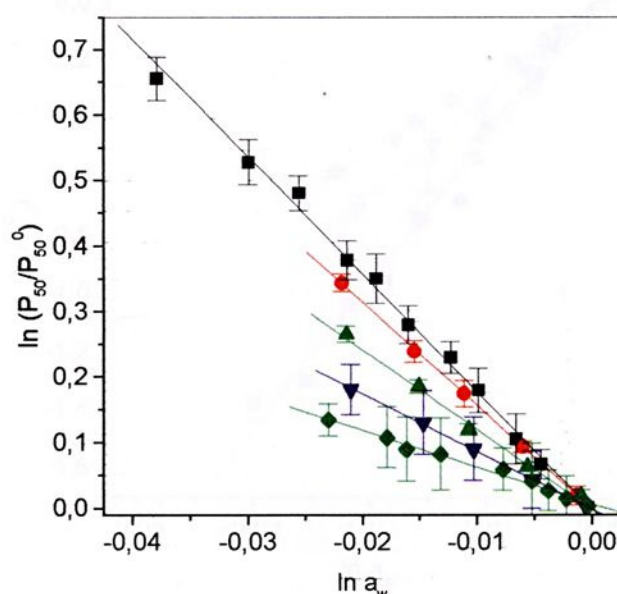


Figura 24: Gráfico da afinidade da Hb A₀ por O_2 em função da atividade de água realizado na ausência ($\blacklozenge$); em 5 ($\blacktriangledown$); 15 ($\blacktriangle$); 25 ($\bullet$) e 100 mM ($\blacksquare$) de NaCl. Os pontos experimentais foram obtidos em solução contendo 10 mM de tampão Hepes, pH 7,3 em diferentes concentrações de sacarose

Como se observa, na ausência de Cl^- a variação média de hidratação na Hb A_0 é de 25 moléculas de água, enquanto que na presença de 100 mM deste sal, esta variação de hidratação é maior, isto é, 72 moléculas de água ligam-se à hemoglobina, durante a sua oxigenação. Esses resultados concordam quantitativamente com medidas anteriores, realizadas por nosso grupo de pesquisa, onde a tonometria foi a técnica experimental aplicada (Colombo & Seixas, 1999).

Neste trabalho apresentamos, originalmente, a influência da concentração de NaCl sobre a variação de hidratação associada a ligação do primeiro oxigênio à Hb (Δn_{wK1}). A figura 25 mostra os pontos experimentais que compõem o gráfico de $\ln (K_1/K_1^0)$ versus $\ln a_w$.

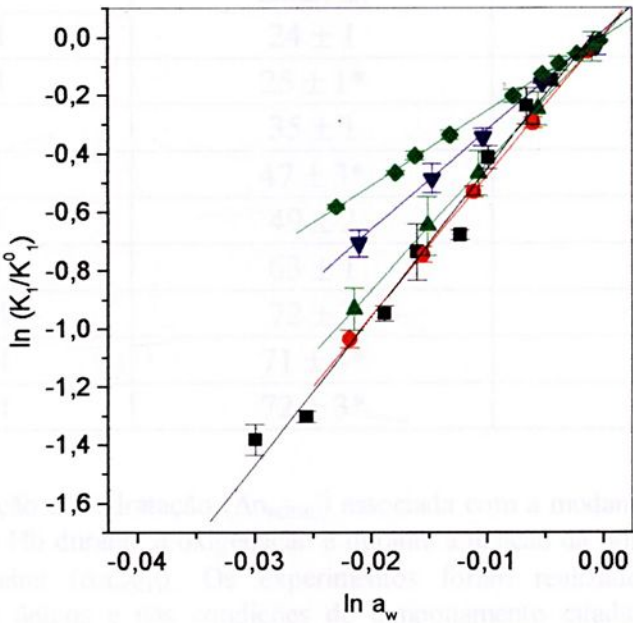


Figura 25: Comportamento da constante de ligação da 1ª molécula de O_2 à Hb A_0 em função da atividade de água, realizado na ausência ($\blacklozenge$); em 5 ($\blacktriangledown$); 15 ($\blacktriangle$); 25 ($\bullet$) e 100 mM ($\blacksquare$) de NaCl. Os pontos experimentais foram obtidos em solução contendo 10 mM de tampão Hepes, pH 7,3 em diferentes concentrações de sacarose.

A variação média de hidratação associada a K_1 é de 25 moléculas de água na ausência de Cl^- , enquanto que, na presença de 100 mM de NaCl esta variação é de $\cong 50$ águas que acompanham a ligação do 1º O_2 à Hb.

Os gráficos apresentados nas figuras 24 e 25 mostram que para uma dada $[NaCl]$ tanto $\ln P_{50}$, quanto $\ln K_1$, variam linearmente com o $\ln a_w$ e que as inclinações dos ajustes lineares aumenta com o aumento da concentração de NaCl. Estes resultados indicam diferentes quantidades de moléculas de água que se ligam à Hb durante a transição da desoxi- T_X para a oxi-R. O valor de Δn_w é maior na presença de elevadas concentrações de NaCl do que na ausência deste sal. A tabela 7 exhibe os valores de Δn_w medidos a cada $[NaCl]$, obtidos tanto para P_{50} como para K_1 .

[NaCl]	$\Delta n_{w(P50)}$	$\Delta n_{w(K1)}$
0.0 mM	24 ± 1	26 ± 2
3,5 mM	$25 \pm 1^*$	
5 mM	35 ± 1	34 ± 1
10 mM	$47 \pm 3^*$	
15 mM	49 ± 2	44 ± 1
25 mM	63 ± 1	48 ± 1
100 mM	72 ± 3	52 ± 2
200 mM	$71 \pm 4^*$	
400 mM	$72 \pm 3^*$	

Tabela 7: Variação de hidratação ($\Delta n_{w(P50)}$) associada com a mudança conformacional que ocorre com a Hb durante a oxigenação e durante a ligação da primeira molécula de oxigênio à proteína ($\Delta n_{w(K1)}$). Os experimentos foram realizados em diferentes concentrações de ânions e nas condições de tamponamento citadas na legenda das figuras 23 e 24.(*) São valores de $\Delta n_{w(P50)}$ determinados por nosso grupo de pesquisa, utilizando a tonometria como técnica experimental (Colombo & Seixas, 1999).

A caracterização total do efeito da concentração do Cl^- sobre $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ é descrito nos gráficos de Δn_w versus $\log [\text{NaCl}]$ mostrados na figura 26.

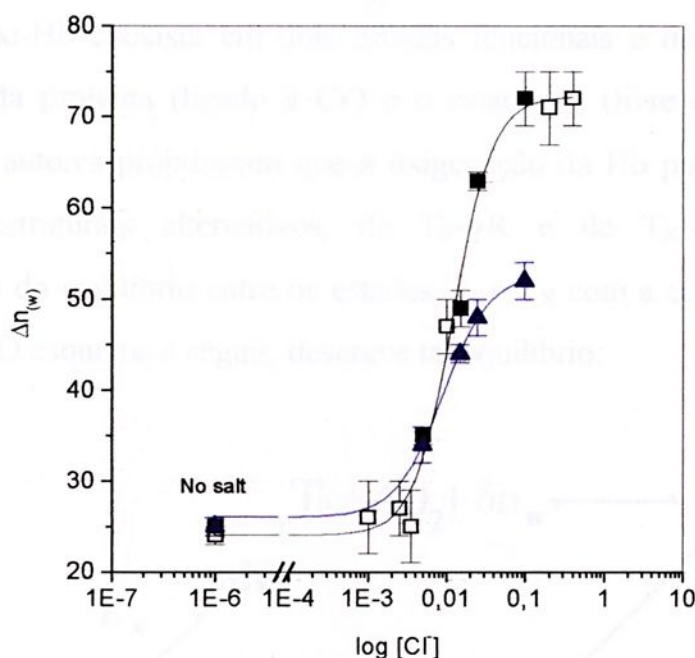


Figura 26: Dependência da variação de hidratação de oxigenação da Hb com a concentração molar de NaCl. (□) São pontos de $\Delta n_{w(P50)}$ obtidos por Colombo e Seixas, 1999, enquanto que (■) são os valores de $\Delta n_{w(P50)}$ e (□) de $\Delta n_{w(K1)}$ obtidos por este autor em 10 mM de tampão Hepes, pH 7,3. A linha contínua azul representa o melhor ajuste logístico sigmoideal, com os seguintes parâmetros: $\Delta n_{w(P50)}^{\text{inicial}} = 24 \pm 2$ moléculas de água; $\Delta n_{w(P50)}^{\text{final}} = 72 \pm 2$ moléculas de água; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 1,74 \pm 0,3$. Entretanto, a linha contínua azul representa o melhor ajuste logístico sigmoideal com os parâmetros: $\Delta n_{w(K1)}^{\text{inicial}} = 26 \pm 0,2$ moléculas de água; $\Delta n_{w(K1)}^{\text{final}} = 53 \pm 0,3$ H₂O; $K_x = 9 \pm 2$ mM; e $n = 1,45 \pm 0,05$.

Os dados revelam que abaixo de $\cong 1$ mM e acima de $\cong 50$ mM de NaCl, o Δn_w permanece em platôs com valores médios constantes de 24 ± 2 e 72 ± 2 moléculas de água para P_{50} , assim como, $26 \pm 0,2$ e $53 \pm 0,3$ moléculas de água para K_1 , respectivamente. Na faixa de concentração de ânions entre 1 mM e 50 mM o Δn_w aumenta de 24 para 72 moléculas de água que se associam à proteína com a oxigenação total e de 26 para 52

moléculas de água que se associam à Hb com a ligação da primeira molécula do ligante.

Nosso grupo de pesquisa mostrou (Colombo & Seixas, 1999) que a influência do NaCl sobre o Δn_w de oxigenação pode ser descrita assumindo que a desoxi-Hb coexista em dois estados funcionais e de hidratação, o estado T_X da proteína (ligado à Cl^-) e o estado T_0 (livre de Cl^-). Neste trabalho os autores propuseram que a oxigenação da Hb pode seguir dois caminhos estruturais alternativos, de $T_0 \rightarrow R$ e de $T_X \rightarrow R$, que são dependentes do equilíbrio entre os estados T_0 e T_X com a concentração do íon cloreto. O esquema a seguir, descreve tal equilíbrio:

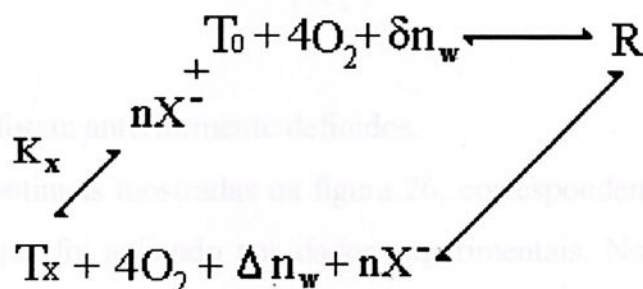


Figura 27: Dependência de Δn_w de oxigenação com a concentração do ânion. Na representação δn_w e Δn_w representam a mudança de hidratação entre os estado T_0 e R e também T_X e R respectivamente; K_x é a constante de equilíbrio aparente de dissociação de X^- ao estado T_X da Hb e nX^- é o número aparente de ânions ligados ao estado T_X da Hb em relação ao R (Seixas, 1998; Colombo & Seixas, 1999).

No esquema, K_x representa a constante aparente de dissociação total do ânion X na transição de $T_X \rightarrow T_0$, n é a estequiometria aparente de ligação e X^- a concentração de ânions. δn_w e Δn_w representam a variação intrínseca de hidratação da Hb que seguem a oxigenação da proteína através dos caminhos de $T_0 \rightarrow R$, e de $T_X \rightarrow R$, respectivamente.

Em qualquer concentração de ânion a variação de hidratação observada com a oxigenação, Δn_w^{Obs} , é dada por,

$$\Delta n_w^{\text{Obs}} = f_{T_0} \cdot \delta n_w + f_{T_X} \Delta n_w \quad (49)$$

onde f_{T_0} e f_{T_X} representam as frações de Hb que são oxigenadas obedecendo a transição entre os estados T_0 para R e T_X para R, respectivamente. Com estas definições o modelo funcional que descreve quantitativamente a relação entre a ligação de O_2 e Cl^- à Hb e a conseqüente variação na conformação de hidratação da proteína, é dado pela equação:

$$\Delta n_w^{\text{Obs}} = \frac{(\delta n_w - \Delta n_w)}{1 + \left(\frac{X}{K_x} \right)^n} + \Delta n_w \quad (50)$$

sendo que, K_x e n foram anteriormente definidos.

As linhas contínuas mostradas na figura 26, correspondem ao melhor ajuste não linear que foi aplicado aos dados experimentais. Nota-se que o ajuste dos valores de $\Delta n_{w(P50)}$ obtidos pelo sistema espectropolarimétrico encontram-se sobrepostos ao ajuste dos valores de $\Delta n_{w(P50)}$ obtidos a partir do método tonométrico (Seixas, 1998; Colombo & Seixas, 1999).

4.6 – Determinação da entalpia e entropia de van't Hoff para a oxigenação da Hb em diferentes concentrações de NaCl e atividades de água.

Uma vez que os íons cloreto atuam como um agente alostérico regulador entre dois caminhos estruturais distintos de oxigenação de Hb, então o calor, e conseqüentemente a entropia de oxigenação devem também depender da $[NaCl]$. A contribuição da concentração de ânions para o ΔH e

ΔS de oxigenação total e para K_1 , foi determinada estudando a dependência de $\ln P_{50}$ e $\ln K_1$ com a temperatura. A figura 28 mostra os gráficos de van't Hoff para a afinidade da Hb por O_2 obtidos em várias concentrações de cloreto e em cinco temperaturas que variam a cada 5°C entre 15 e 35°C .

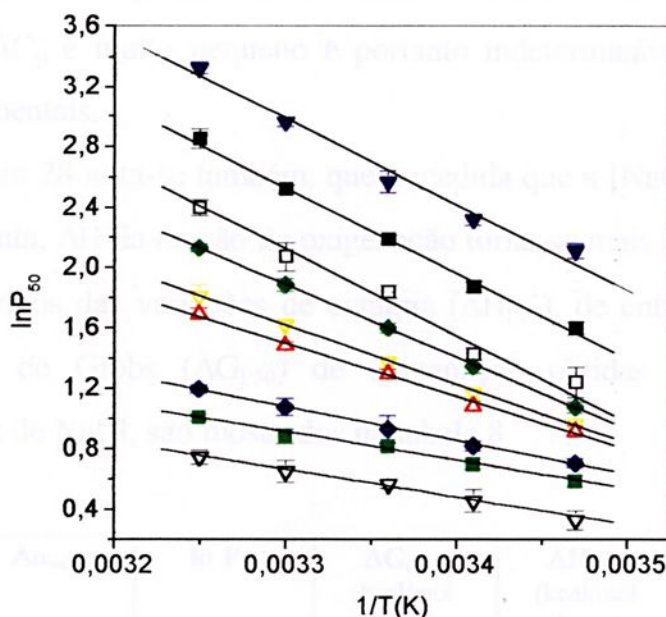


Figura 28: Gráfico de van't Hoff que mostra a dependência da afinidade da Hb A_0 por O_2 com a temperatura. Os pontos experimentais foram medidos em diferentes concentrações de ânions [(∇) 0,0; ($\blacksquare$) 3,5; ($\blacklozenge$) 5; ($\triangle$) 10; (∇) 15; ($\diamond$) 25; ($\square$) 100; ($\blacksquare$) 200 e ($\blacklozenge$) 500 mM NaCl]. O ajuste foi feito de acordo com a equação eq. 51 sendo que a inclinação do gráfico ($\Delta H^0/R$) fornece o valor do calor de oxigenação total envolvido no processo.

O calor de oxigenação total foi determinado pela inclinação do ajuste aplicado aos pontos experimentais, baseado na equação 41.

$$\left. \frac{\partial \ln P_{50}}{\partial (1/T)} \right|_{a_{Cl^-}} = \frac{\Delta H}{R} \quad (51)$$

O comportamento linear apresentado entre $\ln P_{50}$ versus $1/T$ para cada condição experimental, mostra que o calor de oxigenação independe da temperatura. Este comportamento é típico para as reações nas quais a variação da capacidade térmica (ΔC_p) é nula ou possui valores pequenos (Chaires, 1997). Uma exposição mais detalhada da determinação do ΔC_p de oxigenação da Hb é apresentada no anexo A deste trabalho, de onde se conclui que ΔC_p é muito pequeno e portanto indeterminável para nossos dados experimentais.

Na figura 28 nota-se também, que a medida que a $[NaCl]$ presente na solução aumenta, ΔH da reação de oxigenação torna-se mais exotérmico. Os valores numéricos das variações de entalpia (ΔH_{P50}), de entropia (ΔS_{P50}) e energia livre de Gibbs (ΔG_{P50}) de oxigenação obtidas em diferentes concentrações de NaCl, são mostrados na tabela 8.

[Cl] (mM)	$\Delta n_{w(P50)}$	$\ln P_{50}$	$\Delta G_{(P50)}$ (kcal/mol. heme)	$\Delta H_{(P50)}$ (kcal/mol. heme)	$\Delta S_{(P50)}$ (cal/mol.K. heme)
0,0	24±1	0,56±0,02	0,33±0,03	-3,62±0,24	-13,27±0,55
3,5	25±1*	0,81±0,02	0,48±0,01	-3,67±0,10	-13,93±0,77
5,0	35±1	0,93±0,09	0,55±0,06	-4,42±0,13	-16,68±0,13
10	47±3*	1,30±0,03	0,77±0,01	-7,05±0,26	-26,23±0,35
15	49±2	1,37±0,04	0,81±0,02	-7,78±0,75	-28,84±2,00
25	63±1	1,60±0,03	0,95±0,01	-9,54±0,34	-35,19±1,00
100	72±3	1,84±0,04	1,09±0,01	-10,65±0,41	-39,39±1,50
200	71±4*	2,18±0,03	1,29±0,01	-11,23±0,19	-42,03±0,70
400	72±3*				
500		2,57±0,07	1,52±0,02	-11,32±0,35	-43,09±1,00

Tabela 8: A tabela acima mostra os valores: da variação de hidratação associada a transição da desoxi-Hb para oxi-Hb ($\Delta n_{w(P50)}$); da variação de energia livre, entropia e entalpia de oxigenação. (*) São valores de $\Delta n_{w(P50)}$ determinados por nosso grupo de pesquisa (Colombo & Seixas, 1999).



Utilizando o mesmo procedimento experimental mostramos na figura 29 os gráficos de van't Hoff para a constante de associação do primeiro O₂ a hemoproteína, determinados em diversas atividades de Cl⁻ e nas cinco temperaturas citadas.

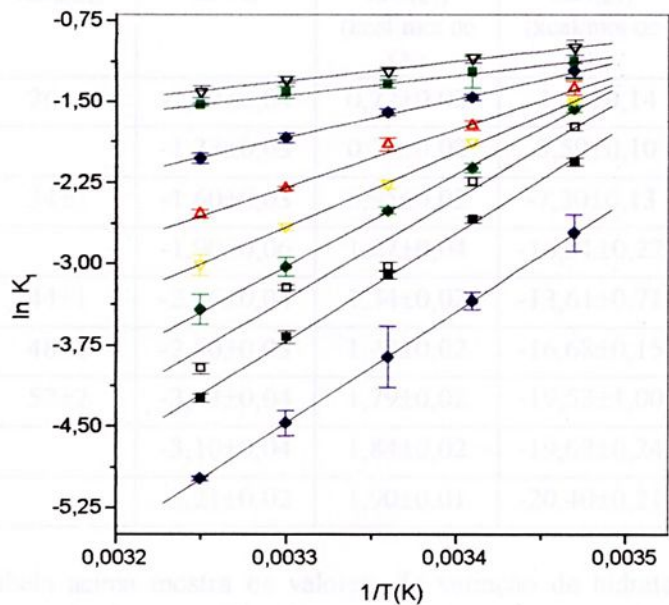


Figura 29: Gráfico de van't Hoff que mostra a dependência de K₁ com a temperatura, medidas em diferentes concentrações de ânions, citadas na legenda anterior. O ajuste foi feito de acordo com a equação eq. 52, sendo qu e a inclinação do gráfico fornece o valor do calor de ligação do primeiro O₂ à Hb A₀.

As linhas contínuas dos gráficos representam o melhor ajuste de:

$$\left. \frac{\partial \ln K_1}{\partial (1/T)} \right|_{aCl^-} = - \frac{\Delta H}{R} \tag{52}$$

Analisando os resultados apresentados na figura 29 assim como para a oxigenação total, notamos que ΔH da reação de ligação do 1º O₂ à Hb torna-se mais exotérmico nas soluções experimentais que apresentam

concentrações mais elevadas de [NaCl] e que o comportamento linear apresentado por $\ln K_1$ com o $1/T$, para cada condição experimental, mostra que o ΔH_{K1} também independe da temperatura. Os valores de $\Delta H_{(K1)}$, $\Delta S_{(K1)}$ e $\Delta G_{(K1)}$ são mostrados na tabela 9.

[Cl] (mM)	$\Delta n_{w(K1)}$	$\ln K_1$	$\Delta G_{(K1)}$ (kcal/mol de O ₂)	$\Delta H_{(K1)}$ (kcal/mol de O ₂)	$\Delta S_{(K1)}$ (cal/mol. de O ₂ . K)
0,0	26±2	-1,22±0,04	0,72±0,02	-3,66±0,14	-14,70±0,4
3,5		-1,33±0,03	0,79±0,02	-3,59±0,10	-14,70±0,3
5,0	34±1	-1,60±0,03	0,95±0,02	-7,30±0,13	-27,68±0,9
10		-1,90±0,06	1,27±0,04	-10,51±0,22	-39,05±0,6
15	44±1	-2,26±0,04	1,34±0,02	-13,61±0,71	-50,16±2,5
25	48±1	-2,50±0,03	1,48±0,02	-16,68±0,15	-60,95±0,9
100	52±2	-3,03±0,04	1,79±0,02	-19,53±1,00	-71,56±3
200		-3,10±0,04	1,84±0,02	-19,62±0,24	-72,01±0,8
500		-3,21±0,02	1,90±0,01	-20,40±0,21	-74,83±0,6

Tabela 9: A tabela acima mostra os valores: da variação de hidratação associada a ligação da 1ª molécula de O₂ à Hb; da variação de energia livre ($\Delta G = -RT\ln K_1$) e variação da entalpia de ligação da primeira molécula de oxigênio a hemoglobina ($\Delta H_{(K1)}$).

Agora é oportuno, citar que os valores de ΔH obtidos neste estudo são compostos pelo calor intrínseco de oxigenação do grupo heme, ΔH_{O_2} , do calor associado a variação conformacional alostérica da estrutura da Hb induzida pela ligação de um ligante em determinada condição experimental (ΔH_{conf})³, além de ΔH_i que é o calor intrínseco de ligação do ligante i (i = H⁺, Cl⁻). $\Delta n_i = n_i^{oxi} - n_i^{desoxi}$ é a diferença no número de ligantes heterotrópicos i ligados entre o estado totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb. (Atha & Ackers, 1974; Imai & Yonetani, 1975; Ackers, 1980, Aminiconi et al., 1981; Razynska et al., 1990). A entalpia de

³ Este calor ainda contém o calor de quebra e formação de pontes salinas (Aminiconi et al., 1981).



protonação do tampão em função da temperatura (ΔH_H^+) não é considerada no cálculo do ΔH_{conf} , uma vez que o pH do tampão utilizado foi ajustado na temperatura do experimento (Imai, 1979, 1982). Portanto:

$$\Delta H = \Delta H_{\text{O}_2} + \Delta H_{\text{conf}} + \Delta n_w \cdot \Delta H_w + \sum_i \Delta n_i \cdot \Delta H_i \quad (53)$$

Nesta equação os valores de Δn_w representam a variação de hidratação na oxigenação e ΔH_w o calor de hidratação associado à Δn_w .

4.7 – Dependência do ΔH de oxigenação total e da ligação da primeira molécula de O_2 em função da concentração do íon cloreto.

A dependência de ΔH_{P50} e ΔH_{K1} com a concentração molar de NaCl é mostrada na figura 30. Os dados revelam que abaixo de 1 mM de NaCl, ΔH_{P50} e ΔH_{K1} permanecem em platôs com valores constantes de $-3,37 \pm 0,36$ kcal/mol.heme e $-3,30 \pm 0,82$ kcal/mol de O_2 , respectivamente, enquanto que, acima de 50 mM de Cl^- , o calor liberado com a oxigenação total da Hb permanece num patamar de $-10,98 \pm 0,30$ kcal/mol.heme e $-19,71 \pm 0,30$ kcal/mol de O_2 para K_1 . Na faixa intermediária de concentração de ânions o ΔH_{P50} , passa de $-3,37$ para $-10,98$ kcal/mol.heme enquanto que, para a ligação da primeira molécula do ligante à proteína o calor liberado vai de $-3,30$ a $-19,71$ kcal/mol de O_2 . Portanto, a diferença máxima entre os valores das variações de calor na presença e ausência de Cl^- ($\delta\Delta H$) é de aproximadamente 7,50 kcal/mol.heme para a oxigenação total e de 16,40 kcal/mol de O_2 para K_1 .

A influência que a concentração do íon cloreto exerce sobre o calor de oxigenação da Hb é semelhante à influência que este ânion exerce sobre

o Δn_w de oxigenação da Hb (fig. 26), ou seja, que tanto o Δn_w^{Obs} quanto o ΔH^{Obs} são influenciados pela mesma constante de associação de cloreto.

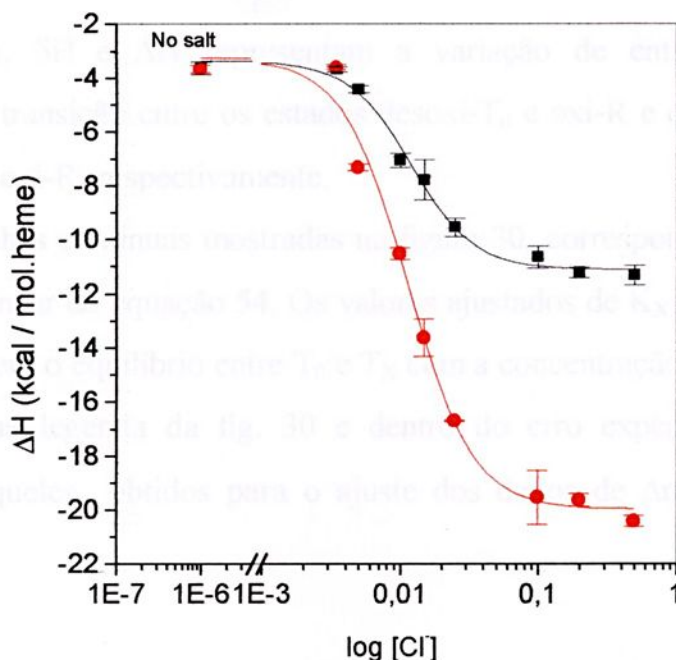


Figura 30: Dependência de (■) ΔH_{P50} e (●) ΔH_{K1} com a concentração molar de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoideal com os seguintes parâmetros para a oxigenação total da Hb: $\Delta H_{P50}^{\text{inicial}} = -3,37 \pm 0,36$ kcal/mol.heme; $\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,98 \pm 0,30$ kcal/mol.heme; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 1,98 \pm 0,36$ e para a associação da primeira molécula do ligante à proteína: $\Delta H_{K1}^{\text{inicial}} = -3,30 \pm 0,82$ kcal/mol de O_2 ; $\Delta H_{K1}^{\text{final}} = -19,71 \pm 0,30$ kcal/mol de O_2 ; $K_x = 11 \pm 1$ mM; e $n = 1,89 \pm 0,34$.

O comportamento apresentado na figura 30 sugere que a equação 50 também pode descrever a dependência funcional do ΔH^{Obs} com a concentração de cloreto. Substituímos na equação em questão a variação de hidratação intrínseca e observada, Δn_w^{Obs} , δn_w e Δn_w , por suas equivalentes em calor, ΔH^{Obs} , δH e ΔH , respectivamente, e obtivemos:

$$\Delta H^{\text{Obs}} = \frac{(\delta H - \Delta H)}{1 + \left(\frac{X}{K_X}\right)^n} + \Delta H \quad (54)$$

Agora, δH e ΔH representam a variação de entalpia intrínseca associada à transição entre os estados desoxi- T_0 e oxi-R e entre os estados desoxi- T_X e oxi-R, respectivamente.

As linhas contínuas mostradas na figura 30, correspondem ao melhor ajuste não linear da equação 54. Os valores ajustados de K_X e n , parâmetros que descrevem o equilíbrio entre T_0 e T_X com a concentração de cloreto, são mostrados na legenda da fig. 30 e dentro do erro experimental são os mesmos daqueles obtidos para o ajuste dos dados de Δn_w^{Obs} versus $\log [\text{NaCl}]$.

4.8 – Dependência do ΔS de oxigenação total e da ligação da primeira molécula de O_2 em função da concentração do íon cloreto.

O comportamento da variação de entropia de oxigenação total (ΔS_{P50}) e da ligação do primeiro ligante à Hb (ΔS_{K1}) com a concentração de cloreto também foi traçado como mostra a figura 31. O valor da variação de entropia de oxigenação foi calculado subtraindo ΔH^{Obs} pela variação de energia livre de oxigenação determinada em 25 °C e na mesma $[\text{NaCl}]$.

A dependência do ΔS^{Obs} de oxigenação com a concentração de Cl^- mostrou-se idêntica com a dependência que a concentração deste ânion exerce sobre a variação de hidratação e de calor de oxigenação, descritas nas figuras 26 e 30, respectivamente. Semelhante a variação de entalpia, o δS e ΔS representam a variação de entropia intrínseca associada à transição

entre os estados desoxi- T_0 e oxi-R e entre os estados desoxi- T_X e oxi-R, respectivamente.

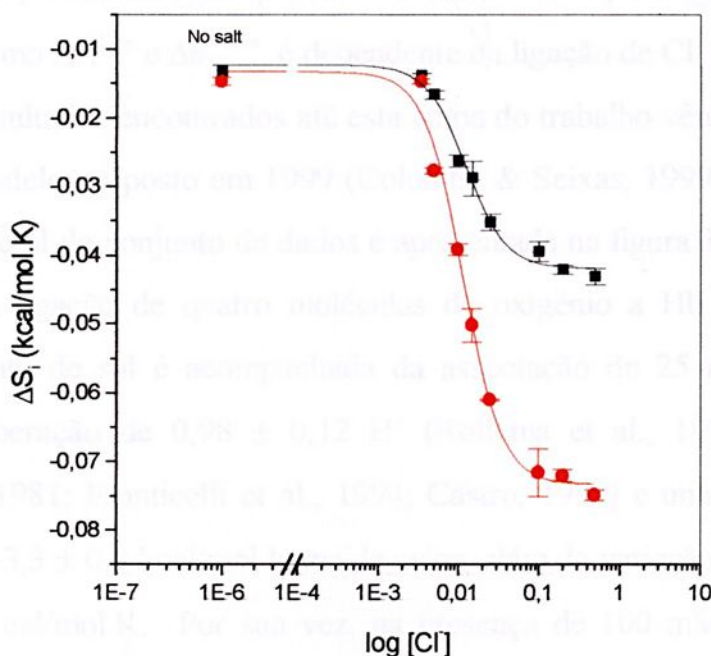


Figura 31: Comportamento de (■) ΔS_{P50} e (●) ΔS_{K1} com a concentração molar de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros para P_{50} : $\Delta S_{P50}^{inicial} = -12 \pm 1$ cal/mol.K; $\Delta S_{P50}^{final} = -42 \pm 1$ cal/mol.K; $K_x = 13 \pm 1$ mM; e $n = 1,78 \pm 0,3$ e para K_1 : $\Delta S_{K1}^{inicial} = -13 \pm 3$ cal/mol.K; $\Delta S_{K1}^{final} = -74 \pm 2$ cal/mol.K; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 1,81 \pm 0,30$.

As linhas contínuas mostradas na figura 31 representam o melhor ajuste dos pontos experimentais quantificando a dependência funcional do ΔS^{Obs} com a concentração de cloreto através de uma expressão semelhante à eq. 50, porém, escrita em termos da variação de entropia intrínseca e da observada.

$$\Delta S^{Obs} = \frac{(\delta S - \Delta S)}{1 + \left(\frac{X}{K_x}\right)^n} + \Delta S \quad (55)$$

A constante aparente de dissociação (K_x) e a estequiometria (n) de Cl^- determinadas, dentro do erro experimental, são iguais aos valores obtidos anteriormente, demonstrando que ΔS^{Obs} é influenciado pela ligação de Cl^- à Hb assim como ΔH^{Obs} e Δn_w^{Obs} , é dependente da ligação de Cl^- à Hb.

Os resultados encontrados até esta etapa do trabalho vêm completar o já citado modelo proposto em 1999 (Colombo & Seixas, 1999), sendo que, uma visão geral do conjunto de dados é apresentada na figura 32 e na tabela 10, onde, a ligação de quatro moléculas de oxigênio a Hb humana, em solução isenta de sal é acompanhada da associação de 25 moléculas de água, da liberação de $0,98 \pm 0,12 \text{ H}^+$ (Rollema et al., 1975; Bucci & Fronticelli, 1981; Fronticelli et al., 1994; Castro, 1999) e uma variação de entalpia de $-3,3 \pm 0,4 \text{ kcal/mol.heme}$ de calor, além da variação de entrópica de $-12 \pm 1 \text{ cal/mol.K}$. Por sua vez, na presença de 100 mM de NaCl, a ligação de água que acompanha a oxigenação desta Hb, aumenta para 72 moléculas, o número de H^+ liberados aumenta para $2,2 \pm 0,12$ (Rollema et al., 1975; Bucci & Fronticelli, 1981; Fronticelli et al., 1994; Castro, 1999) a variação de entalpia agora vale $-10,9 \pm 0,4 \text{ kcal/mol.heme}$ e a de entropia é igual a $-42 \pm 1 \text{ cal/mol.K}$.

Os dados contidos na tabela 10 referentes aos caminhos da reação I, II, III e IV foram obtidos a partir de experimentos previamente estabelecidos, enquanto que, os resultados referentes aos caminhos V e VI foram calculados considerando o ciclo termodinâmico formado entre as estruturas T_0 , T_X e R.

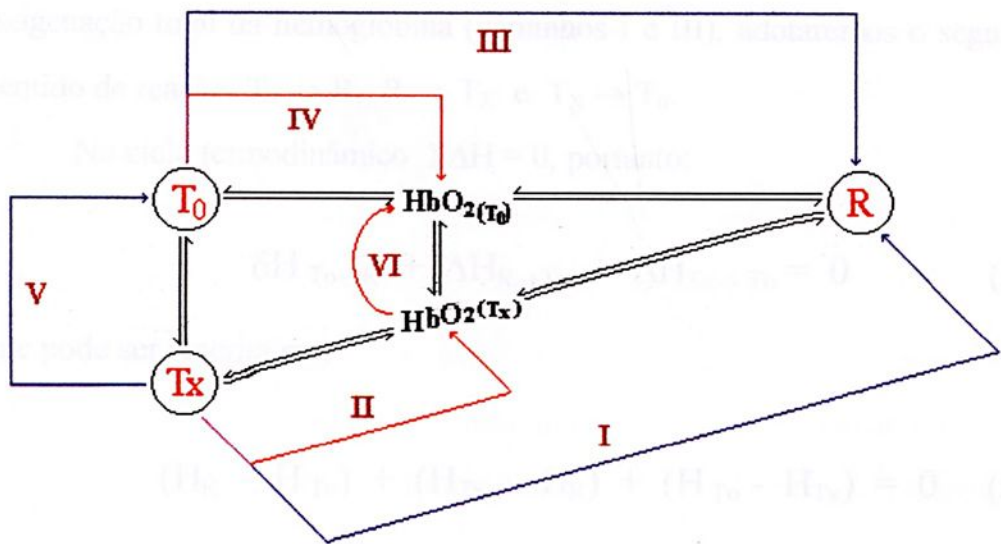


Figura 32: Variações de entalpia, entropia e energia livre que estão associadas às variações conformacionais da hemoglobina.

	Caminho da Reação					
	I ^(*)	II ⁽⁺⁾	III ^(*)	IV ⁽⁺⁾	V ^(*)	VI ⁽⁺⁾
ΔH (kcal/mol)	-10,9 ± 0,3	-19,7 ± 0,3	-3,4 ± 0,4	-3,3 ± 0,8	-7,5 ± 0,7	-16,4 ± 3,8
ΔS (cal/mol.K)	-42 ± 1	-74 ± 2	-12 ± 1	-13 ± 3	-30 ± 2	-61 ± 5
ΔG (kcal/mol)	+1,6 ± 0,6	2,3 ± 0,9	+0,2 ± 0,7	+0,6 ± 0,1	+1,4 ± 1,6	+1,7 ± 1
Δn _{O2} /Hb	+ 4	+ 1	+ 4	+ 1	—	—
Δn _w /Hb	+ 72 ± 2	+ 52 ± 3	+ 25 ± 2	+ 26 ± 3	+ 47 ± 2	—
Δn _{H+} /Hb	-2,2 ± 0,12 [*]	-0,82 ± 0,07 [*]	-0,98 ± 0,12	-0,31 ± 0,03	—	—
Δn _{Cl} ⁻ /Hb	1,98 ± 0,36	1,89 ± 0,34	—	—	+1,32 ± 0,1 [#]	+0,47 ± 0,03 [#]

Tabela 10: Comparação entre o ΔH, ΔS, ΔG, a variação do número de moléculas de água, cloreto e prótons, que acompanham a oxigenação das diferentes estruturas da hemoglobina. (#) Dados publicados por Imaizumi et al., 1979, Aminiconi et al., 1981, Imai, 1982, Chu et al., 1984, Castro, 1999. (*) Dados publicados por Rollema et al., 1975; Bucci & Fronticelli, 1981; Fronticelli et al., 1994; Castro, 1999.

Para exemplificar a sistemática dos cálculos na obtenção dos valores da variação de entalpia, entropia e energia livre que acompanham a

oxigenação total da hemoglobina (caminhos I e III), adotaremos o seguinte sentido de reação: $T_0 \rightarrow R$, $R \rightarrow T_X$ e $T_X \rightarrow T_0$.

No ciclo termodinâmico $\Sigma \Delta H = 0$, portanto:

$$\delta H_{T_0 \rightarrow R} + \Delta H_{R \rightarrow T_X} + \Delta H_{T_X \rightarrow T_0} = 0 \quad (56)$$

que pode ser rescrita em,

$$(H_R - H_{T_0}) + (H_{T_X} - H_R) + (H_{T_0} - H_{T_X}) = 0 \quad (57)$$

onde, isolando $(H_{T_0} - H_{T_X})$ chegamos na expressão 58.

$$(H_{T_0} - H_{T_X}) = (H_{T_0} - H_R) + (H_R - H_{T_X}) \quad (58)$$

substituindo nesta equação o termo $\Delta H_{R \rightarrow T_X}$ pelo valor da variação de entalpia que equivale ao caminho I e $\delta H_{T_0 \rightarrow R}$ pelo ΔH referente ao caminho III, encontramos: $\Delta H_{T_X \rightarrow T_0} = -7,5 \pm 0,7$ kcal/mol. Considerando que a conformação T_X apresenta um conteúdo entálpico maior que a T_0 , com o aumento da temperatura o equilíbrio conformacional da Hb entre as estruturas T_0 e T_X , se desloca para T_X absorvendo calor. Este comportamento térmico justifica a diminuição da afinidade da Hb por O_2 com o aumento da temperatura.

Este procedimento, também foi aplicado para a determinação da variação de entropia que acompanha a transição de $T_X \rightarrow T_0$ tendo o valor de $\Delta S_{T_X \rightarrow T_0}$ igual a $+30 \pm 2$ cal/mol.K. De posse dos valores da variação de entalpia e entropia, calculamos a energia livre correspondente a esta transição, $\Delta G \cong 1,4$ kcal/mol.K. Este valor é consistente com a energia de cooperação medida pela diferença de afinidade pelo O_2 entre o estado

desoxigenado da Hb encapsulada em sílica-gel e com ânions ligados (desoxi- T_X) e o estado desoxigenado da Hb encapsulada, mas sem ânions (desoxi- T_0) (Shibayama & Saigo, 2001).

Utilizando os valores experimentais dos caminhos II e IV e a metodologia anteriormente citada, determinamos $\Delta H_{T_X \rightarrow T_0}$, $\Delta S_{T_X \rightarrow T_0}$ e $\Delta G_{T_X \rightarrow T_0}$ que representam a ligação da 1^o O_2 à proteína, sendo os respectivos valores expostos na coluna que representa o caminho VI da tabela 10.

De acordo com a tabela 10, $-3,4 \pm 0,4$ kcal/mol.heme e $-10,9 \pm 0,3$ kcal/mol.heme, são valores referentes ao ΔH intrínseco atribuído aos equilíbrios $T_0 \rightleftharpoons R$ e $T_X \rightleftharpoons R$, respectivamente. Na figura 30 mostramos que estes valores são encontrados quando ajustamos os pontos experimentais compreendidos na região onde as concentrações de NaCl são menores que 1 mM e maiores que 50 mM, respectivamente. Nestes patamares o ΔH de oxigenação mostrou-se independente da $[Cl^-]$, o que remete a conclusão de que o ΔG de oxigenação da Hb apresenta caráter entrópico. Por sua vez, a porção central do gráfico (fig 30) evidencia que os equilíbrios $T_0 \rightleftharpoons R$ e $T_X \rightleftharpoons R$ estão sendo perturbados pelo deslocamento do equilíbrio $T_0 + X^- \rightleftharpoons T_X$.

Os valores da variação de entropia de oxigenação da Hb (ΔS) foram calculados subtraindo a variação de entalpia da variação de energia livre ($\Delta G = R.T.\ln P_{50}$) de oxigenação, determinados a 25 °C, na mesma concentração de NaCl e na ausência de osmólitos. Assim como a variação de calor, o valor de ΔS quando disposto em gráfico em função de $\log [Cl^-]$ apresenta uma constância acima de 50 mM e outra abaixo de 1 mM de NaCl. $\delta S = -12 \pm 1$ cal/mol.K e $\Delta S = -42 \pm 1$ cal/mol.K são referentes a variação de entropia intrínseca atribuída aos equilíbrios $T_0 \rightleftharpoons R$ e $T_X \rightleftharpoons R$, respectivamente.

4.9 – Relação entre ΔH^{Obs} , ΔS^{Obs} e Δn_w^{Obs} obtidos em função da $[\text{NaCl}]$.

A completa equivalência do efeito de cloreto sobre as variações de hidratação, entalpia e entropia de oxigenação da Hb são mostradas nas figuras a seguir. A partir dos dados apresentados nas figuras 26, 30 e 31 montamos os gráficos de ΔH^{Obs} versus Δn_w^{Obs} e $T\Delta S^{\text{Obs}}$ versus Δn_w^{Obs} . A figura 33 mostra a correlação entre as variações de hidratação, entalpia e entropia de oxigenação total da Hb.

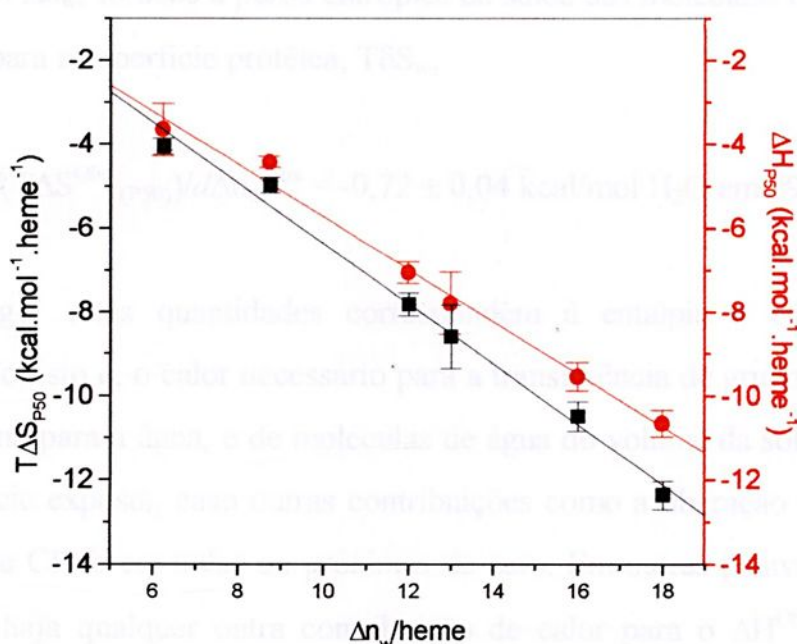


Figura 33: Gráfico de ΔH de oxigenação (●) e ΔS de oxigenação (■) em função de Δn_w . Os dados apresentados nas figuras acima correspondem àqueles mostrados nas figuras 26, 30 e 31. As inclinações dos ajustes lineares aplicados aos pontos experimentais fornecem: $\Delta H_{(p50)}^{\text{Obs}}/d\Delta n_w = -0,63 \pm 0,07$ kcal/mol de H_2O e $Td\Delta S_{(p50)}^{\text{Obs}}/d\Delta n_w^{\text{Obs}} = -0,72 \pm 0,04$ kcal/mol de H_2O em 298 K. Os valores extrapolados para os dados são: $0,64 \pm 0,27$ kcal/mol de H_2O para $d\Delta H_{(p50)}^{\text{Obs}}/d\Delta n_w^{\text{Obs}}$ e $0,54 \pm 0,30$ kcal/mol para $Td\Delta S_{(p50)}^{\text{Obs}}/d\Delta n_w^{\text{Obs}}$.

Como antecipado o calor liberado e a diminuição de entropia, que acompanha o evento molecular associado à ligação de O_2 e modulados pela

T. 1322/05



interação do íon cloreto com a desoxi-Hb são linearmente dependentes do aumento de hidratação protéica. A inclinação do gráfico $\Delta H_{(P50)} \times \Delta n_w$ (fig. 33) fornece o calor necessário para deslocar 1 mol de moléculas de água do volume da solução e liga-las à superfície da proteína durante o processo de oxigenação, δH_w .

$$\delta H_w = d\Delta H_{(P50)}^{Obs} / d\Delta n_w^{Obs} = -0,63 \pm 0,07 \text{ kcal/mol H}_2\text{O}.$$

Do mesmo modo, a inclinação dos pontos que compõem o gráfico de $T\Delta S_{(P50)} \times \Delta n_w$, fornece a perda entrópica da saída das moléculas de água da solução para a superfície protéica, $T\delta S_w$,

$$T\delta S_w = d(T\Delta S_{(P50)}^{Obs}) / d\Delta n_w^{Obs} = -0,72 \pm 0,04 \text{ kcal/mol H}_2\text{O em 298 K}.$$

Logo, estas quantidades correspondem à entalpia e entropia de solvatação, isto é, o calor necessário para a transferência de grupos internos da proteína para a água, e de moléculas de água do volume da solução para a superfície exposta, caso outras contribuições como a liberação de H^+ e a ligação de Cl^- forem nulas ou próximas de zero. Em outras palavras, desde que não haja qualquer outra contribuição de calor para o ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} durante a ligação de O_2 , estes parâmetros representam o custo energético de hidratação protéica em meio aquoso.

Do mesmo modo, na fig. 34 verificamos a equivalência do efeito de cloreto sobre as variações de hidratação, entalpia e entropia que acompanha a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb.

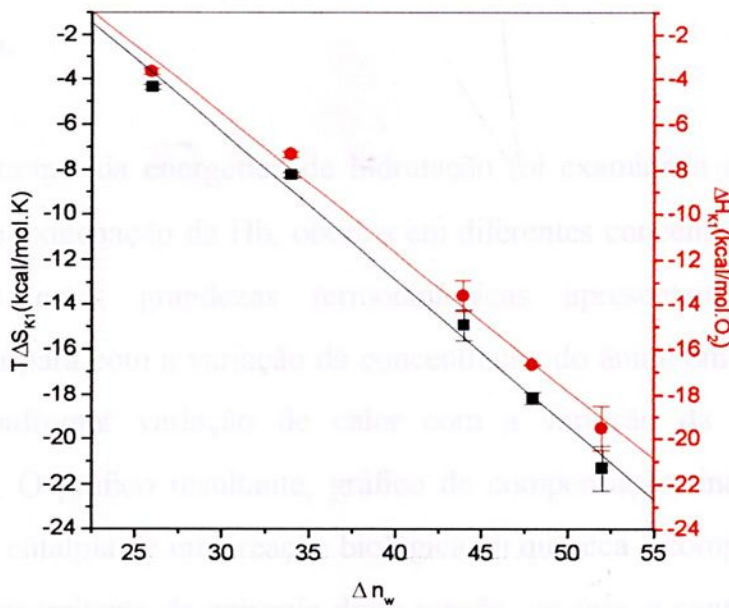


Figura 34: Gráfico de ΔH (●) e ΔS de K_1 (■) contra Δn_w . Os dados apresentados nesta figura correspondem àqueles mostrados nas figuras 26, 30 e 31. As inclinações dos ajustes lineares aplicados aos pontos experimentais, que compõem os gráficos acima fornecem: $d\Delta H^{Obs}_{(K1)}/d\Delta n_w^{Obs} = -0,61 \pm 0,03$ kcal/mol de H_2O e $Td\Delta S^{Obs}_{(K1)}/d\Delta n_w^{Obs} = -0,65 \pm 0,04$ kcal/mol de H_2O em 298 K. Os valores extrapolados para os dados são: $12,94 \pm 1,31$ kcal/mol de H_2O para $d\Delta H^{Obs}_{(K1)}/d\Delta n_w^{Obs}$ e $13,30 \pm 1,43$ kcal/mol para $Td\Delta S^{Obs}_{(K1)}/d\Delta n_w^{Obs}$.

As inclinações dos ajustes lineares aplicados aos pontos experimentais que compõem a figura 34, determinam que:

$$\delta H_w = d\Delta H^{Obs}_{(K1)}/d\Delta n_w^{Obs} = -0,61 \pm 0,03 \text{ kcal/mol } H_2O$$

e

$$T\delta S_w = d(T\Delta S^{Obs}_{(K1)})/d\Delta n_w^{Obs} = -0,65 \pm 0,04 \text{ kcal/mol } H_2O \text{ em } 298 \text{ K.}$$

Estes valores representam o custo entálpico e entrópico para transferir um mol de moléculas de água do volume da solução para a superfície exposta da proteína pela com a ligação do primeiro O_2 .

4.10 – O Fenômeno de Compensação Entalpia - Entropia de Oxigenação.

A natureza da energética de hidratação foi examinada relacionando ΔH e ΔS de oxigenação da Hb, obtidos em diferentes concentrações do íon Cl^- . Como estas grandezas termodinâmicas apresentam a mesma dependência para com a variação da concentração do ânion em questão, foi possível confrontar variação de calor com a variação da entropia de oxigenação. O gráfico resultante, gráfico de compensação, indica como a variação da entalpia de uma reação biológica ou química é compensada pela variação concomitante da entropia desta reação, ou seja, a contribuição das variações do ΔS para as variações de energia livre (ΔG) da reação, são compensadas ao longo das variações simultâneas de ΔH (Imai & Yonetani, 1975; Imai, 1982).

O fenômeno de compensação entalpia-entropia vem sendo extensivamente, estudado em reações entre hemoproteínas e moléculas de ligantes heterotrópicos (Imai & Yonetani, 1975, Imai, 1979, 1982; Antonini et al., 1965, Ikeda-Saito et al., 1983) e a origem deste fenômeno foi atribuída a interação das moléculas de proteína com as de água (Lumry & Rajender 1970), embora nenhuma confirmação direta disto tenha sido encontrada.

A linearidade entre os pontos de $\Delta H_{(P50)}$ e $\Delta S_{(P50)}$ comprova a manifestação do fenômeno de compensação entalpia-entropia para a oxigenação total da Hb A_0 , como observado em muitas reações biológicas e químicas (Lumry & Rajender, 1970). A inclinação do ajuste mostrado na figura 35 fornece a temperatura de compensação, $T_c = 268,5 \pm 2$ K. Nesta temperatura ΔG de oxigenação é zero. Se, observarmos que as variações na entalpia e entropia de oxigenação com as concentrações de cloreto, podem

ser atribuídas principalmente ao custo energético para expor e hidratar a superfície protéica durante a mudança conformacional, então a temperatura de compensação (T_c) é a temperatura em que a diferença na energia livre entre a água ligada, a superfície protéica e a água livre na fase líquida, é nula.

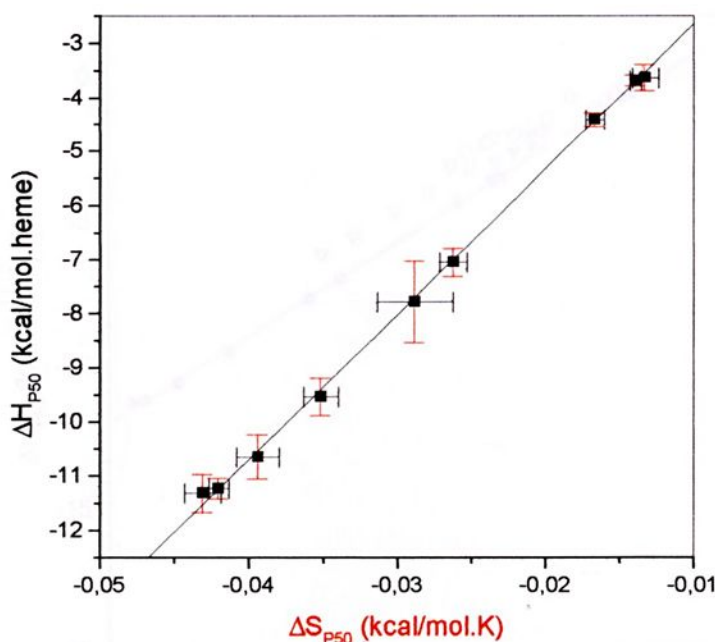


Figura 35: Gráfico de compensação, $\Delta H_{(P50)} \times \Delta S_{(P50)}$, para oxigenação total da Hb. A inclinação de ajuste fornece a temperatura de compensação, cujo valor é de $268,5 \pm 2$ K. O valor do intercepto deste ajuste é de $0,05 \pm 0,05$.

Com a finalidade de distinguir quais grupos, se os hidrofóbicos ou os hidrofílicos, contribuem para a energética de hidratação que esta associada a oxigenação da Hb, comparamos os valores observados das variações de entalpia e entropia de oxigenação, ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} , com os valores da entalpia e entropia de transferência de pequenos grupos químicos de líquidos hidrofóbicos (ou fase gasosa) para água, $\Delta H_{Transf.}$ e $\Delta S_{Transf.}$ (Makhatadze & Privalov, 1993; Privalov & Makhatadze, 1993; Oobatake & Ooi, 1988; Ooi

et al., 1987; Murphy, 1994; Baldwin, 1986) como mostram as figuras 36(a) e (b). Na figura 36(a) reproduzimos o gráfico de compensação mostrado na figura 35 acrescentado a este os valores estimados para variação de entalpia e entropia de grupos hidrofóbicos.

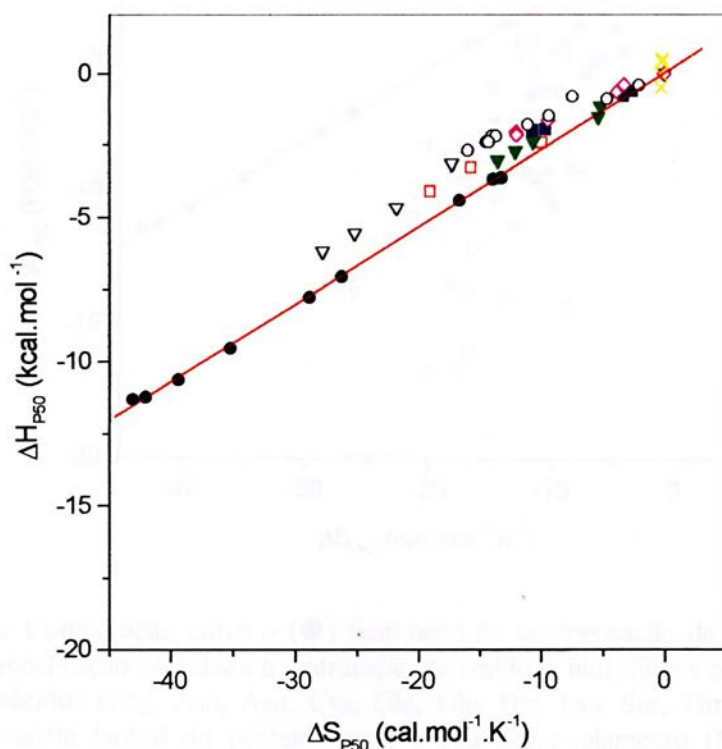


Figura 36(a): Comparação entre o (●) fenômeno de compensação de oxigenação da Hb, com a compensação de hidratação de resíduos hidrofóbicos. Os valores do ΔH e ΔS destes resíduos foram obtidos a partir de trabalhos que calcularam: (□) a compensação de hidratação de aminoácidos (Ala, Ile, Leu, Phe, Trp) da cadeia lateral expostos pela proteína com o seu desnovelamento (Makhataдзе & Privalov, 1993); (■) os valores de ΔH e ΔS de transferência de diferentes grupos ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}<$, $>\text{C}<$, $-\text{C}=\text{}$) da fase gasosa para a água (Privalov & Makhataдзе, 1993); (▽) a energética de dissolução de alcanos da fase gasosa para água (Murphy, 1994); (X) as propriedades termodinâmicas de dissolução de hidrocarbonetos líquidos na água (Baldwin, 1986); (O), (▼) e (◇) que representam os parâmetros de solvatação de resíduos da cadeia lateral (Ala, Ile, Leu, Pro, Val) que são derivados a partir de sistemas modelos de transferência (Ooi et al., 1987; Ootbatake & Ooi, 1988).

Por sua vez, a figura 36(b) mostra um gráfico equivalente ao anterior, mas com dados de transferência de diferentes grupos hidrófilos.

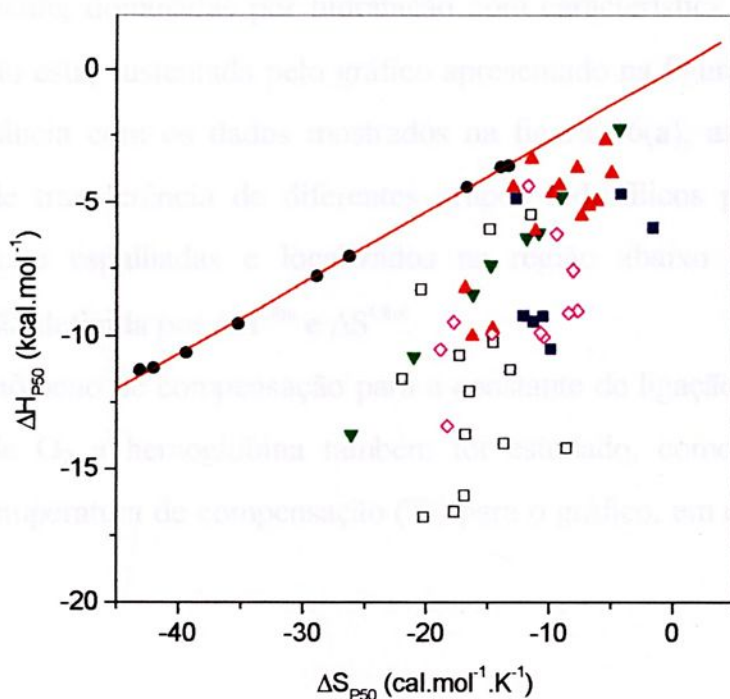


Figura 36(b): Comparação entre o (●) fenômeno de compensação de oxigenação da Hb, com a compensação associada a hidratação de resíduos hidrofílicos obtidos a partir: (□) de aminoácidos (Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Tyr) que são expostos da cadeia lateral da proteína com o seu desnovelamento (Makhatadze & Privalov, 1993); (■) da transferência de diferentes grupos (-OH, -NH₂, >C=O, -COOH, -NH-, -S-, -CH=, -N=, -CONH-) da fase gasosa para a água (Privalov & Makhatadze, 1993); (▲), (▼) e (◇) dos parâmetros de solvatação derivados de sistemas modelos de transferência (Ooi et al., 1987; Ootbatake & Ooi, 1988, Ooi & Ootbatake., 1988).

Os valores numéricos de $\Delta H_{\text{Transf.}}$ e $\Delta S_{\text{Transf.}}$ obtidos pelos autores citados nas legendas das figuras anteriores são mostrados em tabelas presentes no anexo B desta tese.

A nova e interessante informação apresentada no gráfico da fig. 36(a) é que os valores das variações de entalpia e entropia de transferência de diferentes grupos hidrofóbicos para a água, estão localizados próximos e em paralelo com a linha de compensação definida pelos valores experimentais

de ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} . Assumindo que as energias de hidratação dos grupos contribuem aditivamente à energia livre total de uma macromolécula, estes resultados nos levam a interpretação de que as mudanças em ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} são, geralmente, dominadas por hidratação com característica hidrofóbica. Interpretação esta, sustentada pelo gráfico apresentado na figura 36(b) onde em discrepância com os dados mostrados na figura 36(a), as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrofílicos para a água, estão bastante espalhadas e localizados na região abaixo da linha de compensação definida por ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} .

O fenômeno de compensação para a constante de ligação da primeira molécula de O_2 a hemoglobina também foi estudado, como ilustrado a seguir. A temperatura de compensação (T_c) para o gráfico, em questão, vale 282 ± 2 K.

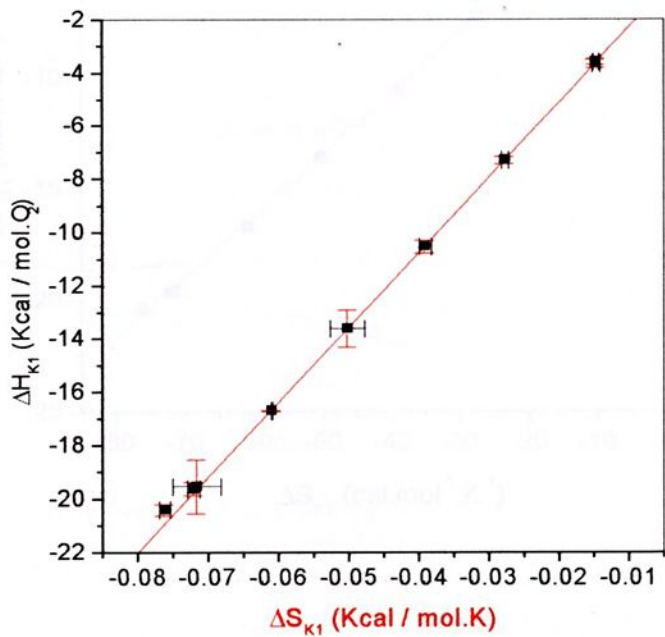


Figura 37: Gráfico de compensação para a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb, $\Delta H_{(K1)} \times \Delta S_{(K1)}$. A temperatura de compensação (T_c) corresponde à 282 ± 2 K, com intercepto de $0,38 \pm 0,11$.

A natureza energética que acompanha a hidratação que esta associada ligação do 1º O₂ à Hb, também foi estudada confrontando os valores observados das variações de entalpia e entropia de K₁ com os valores de $\Delta H_{\text{Transf.}}$ e $\Delta S_{\text{Transf.}}$. Na figura 38 (a) reproduzimos o gráfico de compensação mostrado na figura 37, agora acrescido dos valores estimados para variação de entalpia e entropia de grupos hidrofóbicos, enquanto que, um gráfico equivalente, mas com dados de transferência de diferentes grupos hidrófilos é mostrado na figura 38 (b).

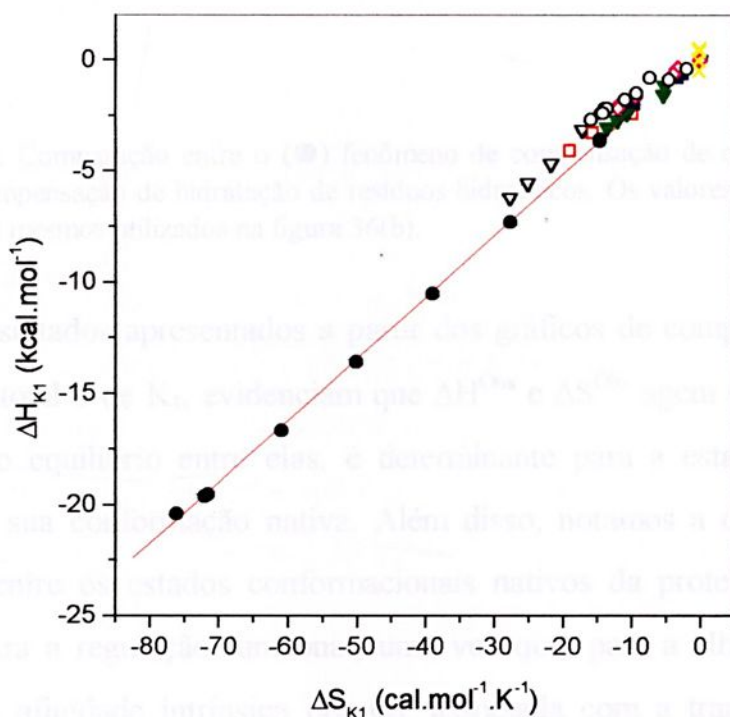


Figura 38(a): Comparação entre o (●) fenômeno de compensação de oxigenação da Hb, com a compensação de hidratação de resíduos hidrofóbicos. Os valores de $\Delta H_{\text{Transf.}}$ e $\Delta S_{\text{Transf.}}$ são os mesmos utilizados na composição da figura 36(a).

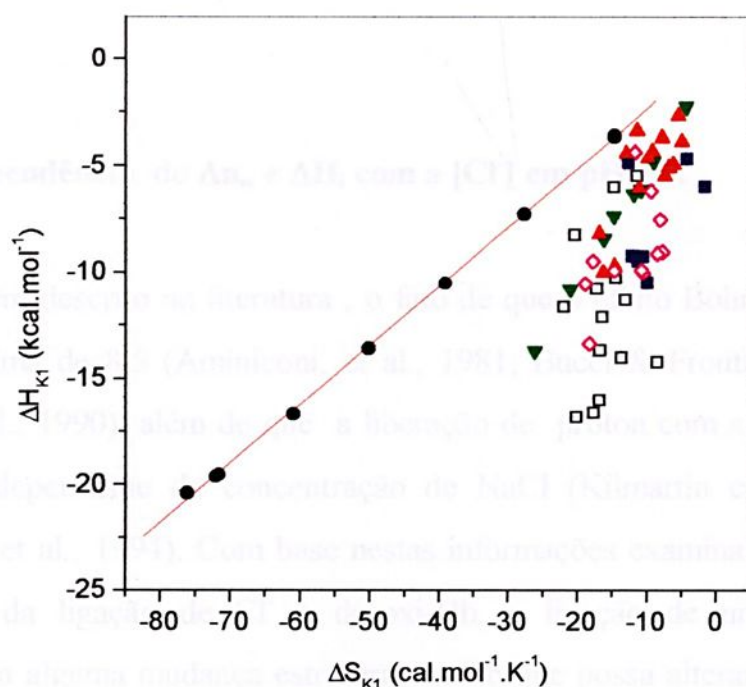


Figura 38(b): Comparação entre o (●) fenômeno de compensação de oxigenação da Hb, com a compensação de hidratação de resíduos hidrofílicos. Os valores de $\Delta H_{\text{Transf.}}$ e $\Delta S_{\text{Transf.}}$ são os mesmos utilizados na figura 36(b).

Os resultados apresentados a partir dos gráficos de compensação de oxigenação total e de K_1 , evidenciam que ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} agem em direções opostas, e o equilíbrio entre elas, é determinante para a estabilidade da proteína na sua conformação nativa. Além disso, notamos a diferença de hidratação entre os estados conformacionais nativos da proteína também contribui para a regulação funcional, uma vez que, para a Hb humana, o aumento da afinidade intrínseca por O_2 , associada com a transição entre estados alostéricos, é sempre seguido pela ligação de água. O custo energético para a mudança conformacional da desoxi-Hb para oxi-Hb ($\Delta G > 0$) é compensado pelo ganho de energia livre de ligação de O_2 com a maior afinidade apresentada pela estrutura R.

4.11 – Dependência do Δn_w e ΔH_i com a $[Cl^-]$ em pH 9,0.

É bem descrito na literatura, o fato de que o efeito Bohr não ocorre em pH acima de 8,5 (Aminiconi, et al., 1981; Bucci & Fronticelli, 1981; Busch et al., 1990), além de que a liberação de próton com a oxigenação da Hb é dependente da concentração de NaCl (Kilmartin et al., 1980, Fronticelli et al., 1994). Com base nestas informações examinamos se, sob influência da ligação de Cl^- a desoxi-Hb, a ligação de um H^+ extra proporciona alguma mudança estrutural na Hb que possa alterar o valor de Δn_w , ΔH e ΔS de oxigenação.

4.11.1) Comportamento do Δn_w em pH 9,0.

As variações de hidratação, Δn_w , que acompanham a transição da desoxi-Hb para a oxi-Hb e a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb, em pH 9,0, foram medidas como mostra as figuras 39 e 40. Estas figuras mostram como P_{50} e K_1 se comportam a medida que a atividade de água da solução diminui. Os experimentos foram realizados em 10 mM de tampão Ches, a 25 °C, na ausência de sal e na presença de 15 e 100 mM de NaCl.

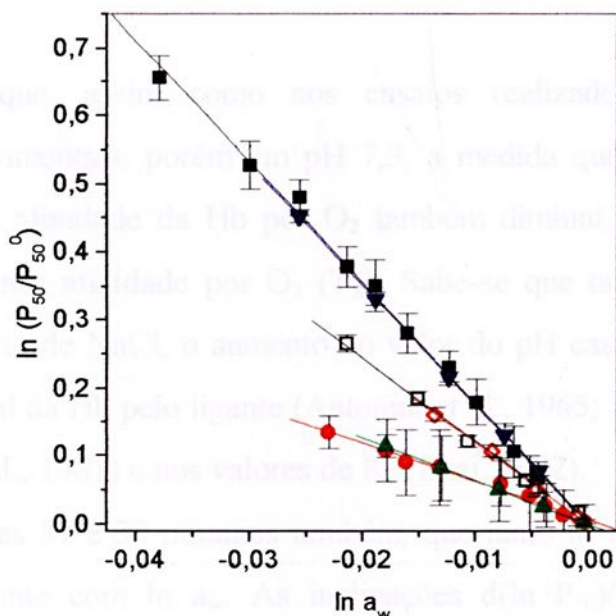


Figura 39: Gráfico da afinidade da Hb A₀ em função de a_w observado em pH 7,3 e 9,0. Os pontos experimentais foram obtidos em solução contendo 10 mM de tampão Hepes, sem ânion (●), com 15 mM (□) e 100 mM de NaCl (■) para pH 7,3 em diferentes concentrações de sacarose e 10 mM de tampão Ches, sem ânion (◻), com 15 mM (◻) e 100 mM de NaCl (◼) para pH 9,0 em diferentes concentrações do soluto neutro.

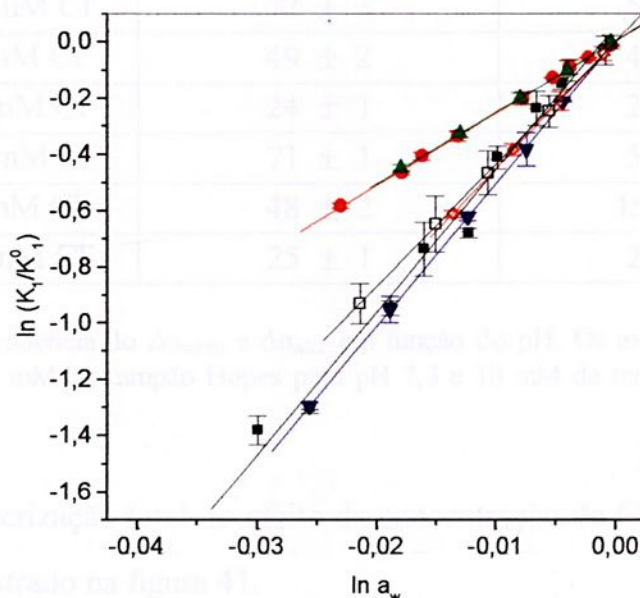


Figura 40: Comportamento de K_1 em função de a_w observado em pH 7,3 e 9,0. Os pontos representados nesta figura foram obtidos nas mesmas condições experimentais apresentadas na legenda anterior.

Nota-se que, assim como nos ensaios realizados nas mesmas condições experimentais, porém em pH 7,3, a medida que a atividade de água diminui, a afinidade da Hb por O₂ também diminui, estabilizando a estrutura de menor afinidade por O₂ (T_X). Sabe-se que tanto na presença como na ausência de NaCl, o aumento no valor do pH causa um aumento, da afinidade total da Hb pelo ligante (Antonini et al., 1965; Aminiconi et al., 1981, Bucci et al., 1981) e nos valores de K₁ (Imai, 1982).

Nas figuras 37 e 38 notamos também, que tanto ln P₅₀ quanto ln K₁ variam linearmente com ln a_w. As inclinações d(ln P₅₀)/d(ln a_w) e d(ln K₁)/d(ln a_w) revelaram-se diferentes para cada [NaCl], implicando que Δn_{w(P50)} e Δn_{w(K1)} aumentam com o aumento da [NaCl], como mostra a tabela 11.

Condição experimental	Δn _(P50)	Δn _(K1)
pH 7,3; 100 mM Cl ⁻	72 ± 3	52 ± 2
pH 7,3; 15 mM Cl ⁻	49 ± 2	44 ± 1
pH 7,3; 0,0 mM Cl ⁻	24 ± 1	26 ± 2
pH 9,0; 100 mM Cl ⁻	71 ± 1	51 ± 1
pH 9,0; 15 mM Cl ⁻	48 ± 2	45 ± 0,5
pH 9,0; 0,0 mM Cl ⁻	25 ± 1	26 ± 1

Tabela 11: Dependência do Δn_{wP50} e Δn_{wK1} em função do pH. Os experimentos foram realizados em 10 mM de tampão Hepes para pH 7,3 e 10 mM de tampão Ches para o pH 9,0.

A caracterização total do efeito da concentração do Cl⁻ sobre Δn_{w(P50)} e Δn_{w(K1)} é mostrado na figura 41.

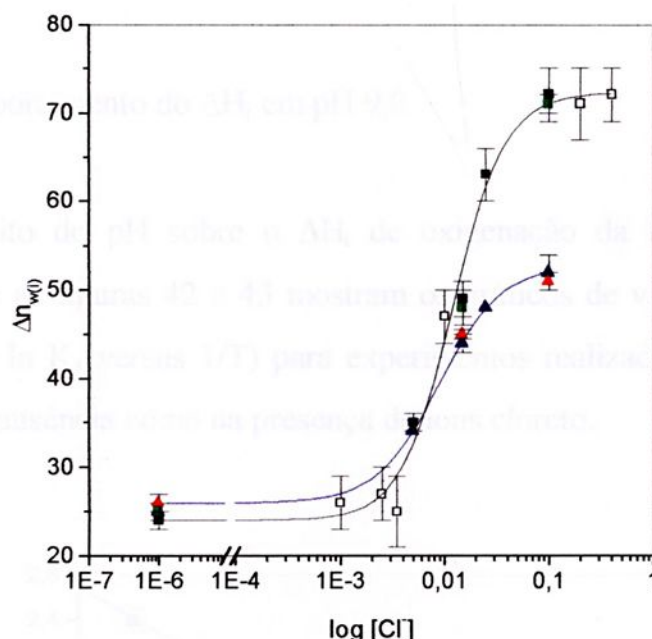


Figura 41: Gráfico acima mostra a dependência da mudança de hidratação que acompanha a oxigenação total da Hb humana, em 10 mM de tampão Hepes, contra a concentração molar de NaCl. (□) São valores experimentais obtidos por Colombo e Seixas, 1999 e (■) pelo autor nas condições de tamponamento em pH 7,3; enquanto que (■) é referente a ensaios realizados a pH 9,0. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal, com os seguintes parâmetros: $\Delta n_{wP50}^{\text{inicial}} = 24 \pm 2$ moléculas de água; $\Delta n_{wP50}^{\text{final}} = 72 \pm 2$ moléculas de água; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 1,78 \pm 0,3$. O comportamento da mudança de hidratação que acompanha a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb humana, em 10 mM de tampão Hepes, contra a concentração molar de NaCl. (▲) São valores experimentais obtidos em pH 7,3 e (▲) pH 9,0. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal, com os seguintes parâmetros: $\Delta n_{wK1}^{\text{inicial}} = 26 \pm 0,2$ moléculas de água; $\Delta n_{wK1}^{\text{final}} = 53 \pm 0,3$ moléculas de água; $K_x = 9 \pm 2$ mM e $n = 1,45 \pm 0,05$.

O fato dos pontos que representam a variação de hidratação que acompanha a oxigenação total da Hb, $\Delta n_{(wP50)}$, e a ligação do primeiro O_2 a esta proteína, $\Delta n_{(wK1)}$, medidos em pH 9,0, estarem sobrepostos aos pontos que são referentes a estas variações de hidratação medidas em pH 7,3, reforça a proposição de que o pH não influencia na determinação Δn_w relacionado com a transição da desoxi-Hb para a oxi-Hb e com a determinação de K_1 .

4.11.2) Comportamento do ΔH_i em pH 9,0.

O efeito do pH sobre o ΔH_i de oxigenação da Hb, também foi investigado e as figuras 42 e 43 mostram os gráficos de van't Hoff ($\ln P_{50}$ versus $1/T$ e $\ln K_1$ versus $1/T$) para experimentos realizados em pH 7,3 e 9,0, tanto na ausência como na presença de íons cloreto.

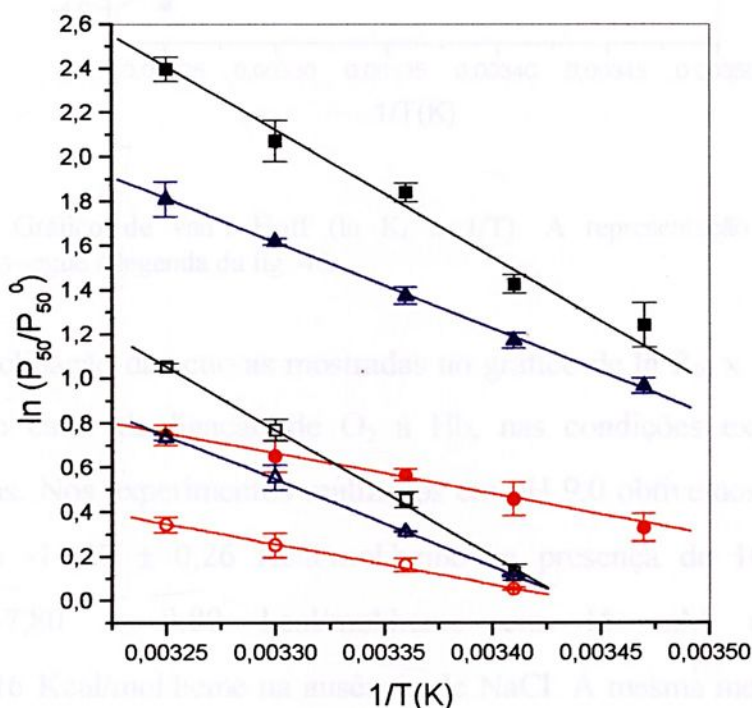


Figura 42: Gráficos de van't Hoff ($\ln P_{50} \times 1/T$). No gráfico os pontos experimentais foram obtidos nas seguintes condições: 10 mM de tampão Hepes, pH 7,3, (●) na ausência de ânions, (□) em 15 mM e (■) 100 mM de NaCl, enquanto que no gráfico as condições experimentais foram: 10 mM de tampão Ches, pH 9,0, (○) sem ânion, (△) 15 mM e (□) 100 mM de NaCl.

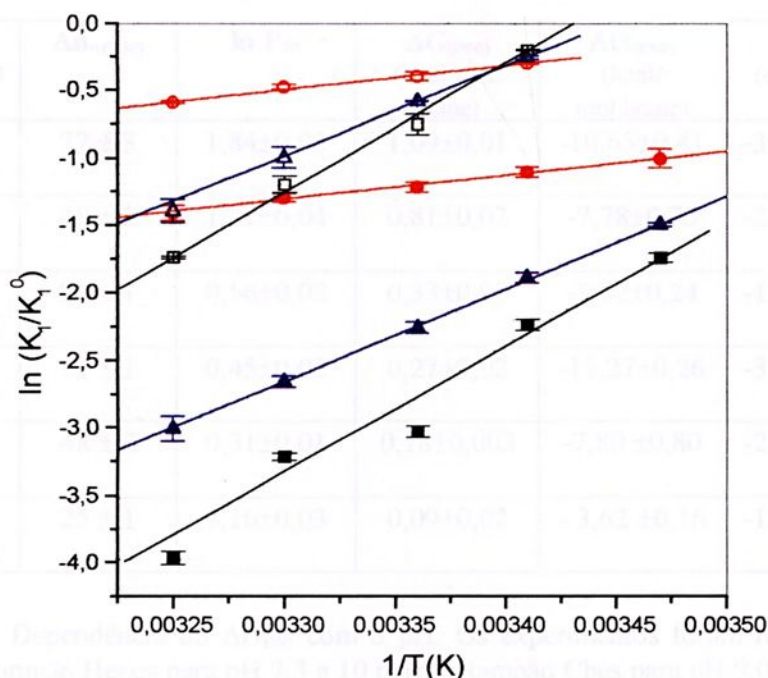


Figura 43: Gráfico de van't Hoff ($\ln K_1 \times 1/T$). A representação dos pontos experimentais segue a legenda da fig. 40.

A inclinação das curvas mostradas no gráfico de $\ln P_{50} \times 1/T$ fornece o valor do calor de ligação de O_2 à Hb, nas condições experimentais investigadas. Nos experimentos realizados em pH 9,0 obtivemos um ΔH de oxigenação $-11,27 \pm 0,26$ Kcal/mol.heme na presença de 100 mM de cloreto, $-7,80 \pm 0,80$ kcal/mol.heme em 15 mM do sal e $-3,62 \pm 0,16$ Kcal/mol.heme na ausência de NaCl. A mesma metodologia é aplicada aos gráficos de van't Hoff obtidos para K_1 , (fig. 43), e os valores de ΔH de oxigenação obtidos foram $-19,12 \pm 0,15$ kcal/mol. O_2 na presença de 100 mM NaCl, $-3,64 \pm 0,11$ kcal/mol. O_2 nos ensaios realizados na ausência de NaCl e $-13,28 \pm 0,31$ kcal/mol. O_2 em 15 mM Cl⁻. Estes valores são mostrados nas tabelas 12 e 13, onde os comparamos com os resultados encontrados nas mesmas condições experimentais, porém em pH 7,3.

Condição experimental I	$\Delta n_{w(P50)}$	$\ln P_{50}$	$\Delta G_{(P50)}$ (kcal/mol. heme)	$\Delta H_{(P50)}$ (kcal/mol. heme)	$\Delta S_{(P50)}$ (cal/mol.K. heme)
pH 7,3; 100 mM Cl ⁻	72 ± 3	$1,84 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,01$	$-10,65 \pm 0,41$	$-39,39 \pm 1,50$
pH 7,3; 15 mM Cl ⁻	49 ± 2	$1,37 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,02$	$-7,78 \pm 0,75$	$-28,84 \pm 2,60$
pH 7,3; isento de Cl ⁻	24 ± 1	$0,56 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$	$-3,62 \pm 0,24$	$-13,27 \pm 0,50$
pH 9,0; 100 mM Cl ⁻	71 ± 1	$0,45 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	$-11,27 \pm 0,26$	$-38,72 \pm 1,00$
pH 9,0; 15 mM Cl ⁻	48 ± 2	$0,31 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,003$	$-7,80 \pm 0,80$	$-26,79 \pm 2,70$
pH 9,0; isento de Cl ⁻	25 ± 1	$0,16 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$	$-3,62 \pm 0,16$	$-12,47 \pm 0,26$

Tabela 12: Dependência do ΔH_{P50} com o pH. Os experimentos foram realizados em 10 mM de tampão Hepes para pH 7,3 e 10 mM de tampão Ches para pH 9,0.

Condição experimental I	$\Delta n_{w(K1)}$	$\ln K_1$	$\Delta G_{(K1)}$ (kcal/mol. O ₂)	$\Delta H_{(K1)}$ (kcal/mol. O ₂)	$\Delta S_{(K1)}$ (cal/mol O ₂ .K)
pH 7,3; 100 mM Cl ⁻	52 ± 2	$-3,03 \pm 0,04$	$1,79 \pm 0,02$	$-19,53 \pm 1,00$	$-71,56 \pm 3,0$
pH 7,3; 15 mM Cl ⁻	44 ± 1	$-2,26 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,02$	$-13,60 \pm 0,14$	$-50,16 \pm 2,5$
pH 7,3; isento de Cl ⁻	26 ± 2	$-1,22 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,02$	$-3,66 \pm 0,24$	$-14,70 \pm 0,4$
pH 9,0; 100 mM Cl ⁻	51 ± 1	$-0,75 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,04$	$-19,12 \pm 0,15$	$-65,66 \pm 0,5$
pH 9,0; 15 mM Cl ⁻	$45 \pm 0,5$	$-0,58 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$	$-13,28 \pm 0,31$	$-45,73 \pm 1,0$
pH 9,0; isento de Cl ⁻	26 ± 1	$-0,40 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$	$-3,64 \pm 0,11$	$-13,06 \pm 0,4$

Tabela 13: Dependência do ΔH_{K1} com o pH. Os experimentos foram realizados em 10 mM de tampão Hepes para pH 7,3 e 10 mM de tampão Ches para pH 9,0.

A dependência de ΔH_{P50} e ΔH_{K1} com a concentração de molar de NaCl, medida em pH 7,3 e pH 9,0, é mostrada na figura 44.

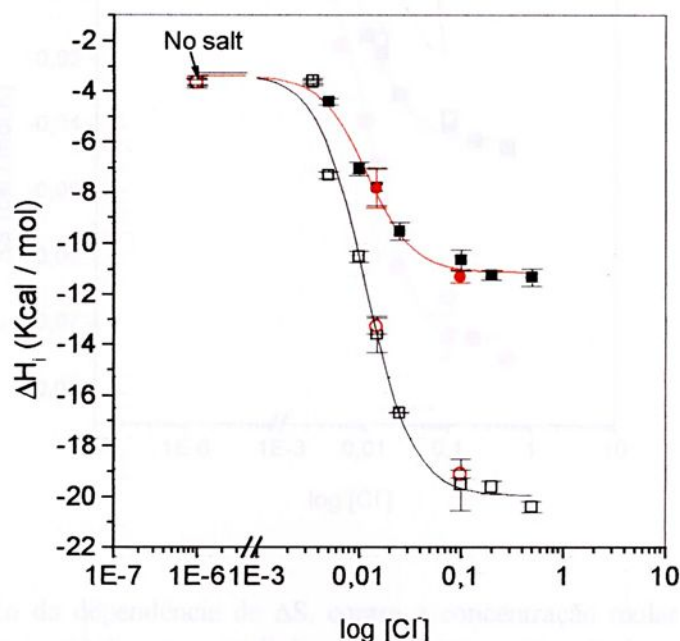


Figura 44: Gráfico da dependência de ΔH_i contra a concentração molar de NaCl. Os valores de ΔH foram obtidos nas condições de tamponamento citadas anteriormente, em (■) pH 7,3 e (□) pH 9,0. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os parâmetros: $\Delta H_{P50}^{\text{inicial}} = -3,37 \pm 0,36$ kcal/mol.heme; $\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,98 \pm 0,30$ kcal/mol.heme; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 2 \pm 0,36$, para a dependência de $\Delta H_{(P50)}$ contra $\log (Cl^-)$. Por sua vez, o comportamento de $\Delta H_{(K1)}$ contra $\log (Cl^-)$, em (□) pH 7,3 e (○) pH 9,0, fornece os parâmetros: $\Delta H_{K1}^{\text{inicial}} = -3,26 \pm 0,27$ kcal/mol.O₂; $\Delta H_{K1}^{\text{final}} = -19,97 \pm 0,51$ kcal/mol.O₂; $K_x = 11 \pm 0,5$ mM; e $n = 1,84 \pm 0,30$.

O comportamento de ΔS_{P50} e ΔS_{K1} com a concentração molar de NaCl, em pH 7,3 e pH 9,0, também foi determinado como mostra a fig. 45.

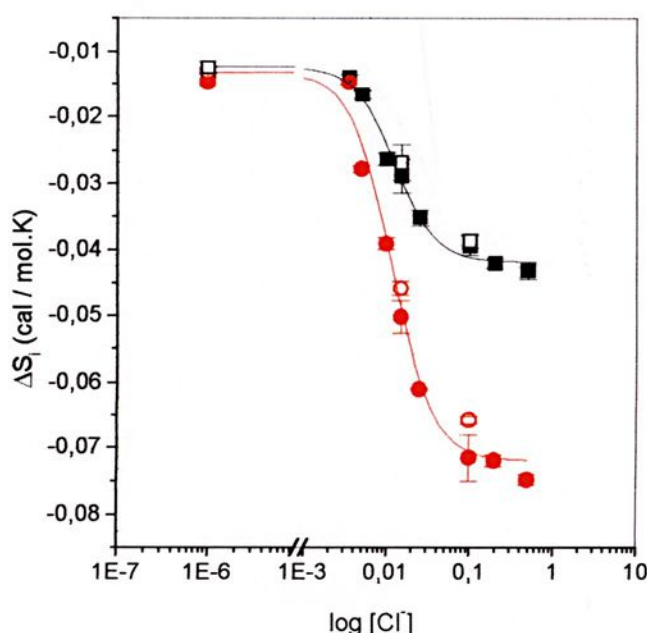


Figura 45: Gráfico da dependência de ΔS_i contra a concentração molar de NaCl. Os valores de ΔS foram obtidos nas condições de tamponamento citadas anteriormente, tanto em (■) pH 7,3 como em (□) pH 9,0. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os parâmetros: $\Delta S_{P50}^{\text{inicial}} = -12 \pm 1$ cal/mol.K; $\Delta S_{P50}^{\text{final}} = -42 \pm 1$ cal/mol.K; $K_x = 13 \pm 1$ mM; e $n = 1,78 \pm 0,3$, para a dependência de $\Delta S_{(P50)}$ contra $\log (Cl^-)$. Por sua vez, o comportamento de $\Delta S_{(K1)}$ contra $\log (Cl^-)$, em (□) pH 7,3 e (○) pH 9,0, fornece os seguintes parâmetros: $\Delta S_{K1}^{\text{inicial}} = -13 \pm 3$ cal/mol.K; $\Delta S_{K1}^{\text{final}} = -74 \pm 2$ cal/mol.K; $K_x = 12 \pm 1$ mM; e $n = 1,81 \pm 0,30$.

A sobreposição dos pontos que representam a variação de entalpia de oxigenação total da Hb, $\Delta H_{(P50)}$, e de entropia, $\Delta S_{(P50)}$, medidos em pH 9,0, com os pontos referentes às mesmas variações medidos em pH 7,3, levou-nos a propor que o pH não influencia na determinação ΔH e ΔS relacionados com a transição da desoxi-Hb para a oxi-Hb. O mesmo raciocínio é utilizado quando analisamos o efeito do pH na determinação da variação de entalpia que acompanha a ligação do 1^o O_2 à Hb.

O comportamento de ΔH e ΔS (de P_{50} e K_1) em função da $[Cl^-]$ mostraram-se rigorosamente paralelos a variação de hidratação $\Delta n_{(wP50)}$ e $\Delta n_{(wK1)}$ com a concentração molar de cloreto.

5.1 - Efeito da atividade de água sobre a atividade de Hb por O_2 e sobre K_2 .

A obtenção de curvas de equilíbrio de dissociação da Hb realizadas em várias concentrações de solutos neutros, possibilita a determinação da dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água. A curva de equilíbrio a $a_{H_2O} = 1$ é a curva de referência. A dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo. Segundo o método de ajuste de curvas de mínimos quadrados, a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo. Segundo o método de ajuste de curvas de mínimos quadrados, a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo.

5 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta investigação mostram que a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo. Segundo o método de ajuste de curvas de mínimos quadrados, a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo.

Os resultados obtidos nesta investigação mostram que a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo. Segundo o método de ajuste de curvas de mínimos quadrados, a dependência da atividade de Hb por O_2 com a atividade de água é dada por: $a_{Hb} = a_{Hb}^0 \cdot a_{H_2O}^n$, onde a_{Hb}^0 é a atividade de Hb por O_2 a $a_{H_2O} = 1$, e n é o número de moléculas de água envolvidas no processo.

5.1 - Efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb por O₂ e sobre K₁.

A obtenção de curvas de equilíbrio de oxigenação da Hb contínuas, em várias concentrações de solutos neutros, possibilitou a determinação da dependência da afinidade da Hb A₀ por O₂ com a atividade de água. A diminuição da atividade de água da solução desloca as curvas de oxigenação para a direita, indicando a diminuição da afinidade da Hb por O₂, isto é, aumento no valor de P₅₀. Segundo o método de stresse osmótico (Colombo et al., 1992) a dependência linear entre $\ln P_{50}$ e $\ln a_w$ associada com a utilização da equação de linkage de Wyman (Wyman, 1964; Wyman & Gill, 1990), permite a determinação do número aparente de moléculas de água envolvidas durante a transição da desoxi-T para a oxi-R. Nas condições experimentais apresentadas na figura 14 esta variação de hidratação corresponde a ligação de 72 ± 3 moléculas de água. Este valor de diferença de hidratação entre as formas totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada da Hb concorda com valores anteriormente determinados por Colombo e colaboradores (Colombo et al., 1992, 1996).

O valor de 72 moléculas de água é também coerente com a diferença de área de superfície acessível ao solvente entre as estruturas desoxi (T_X) e a oxi (R) da hemoglobina. Chothia e colaboradores em 1976 computaram as áreas expostas pelas estruturas oxi e desoxi da Hb, e determinaram que a estrutura oxi-R expõe de 500 a 800 Å² mais de superfície do que a proteína na forma desoxi-T_X da Hb (Chothia et al., 1976; Lesk et al., 1985). Considerando que uma molécula de água pode cobrir aproximadamente de 9 a 10 Å² de superfície, calcula-se que de 55 a 90 moléculas de água são necessárias para hidratar a superfície extra da forma oxi da Hb (Colombo et al., 1992, 1996). Posteriormente, o valor de 70 moléculas de água foi confirmado por intermédio de cálculos que utilizaram as estruturas

cristalinas de Hb, oxi-R2 (Silva et al., 1992) e deoxi-T, crescidas a baixas condições de sal (Kavanaugh et al., 1992). Mais recentemente, a partir de medidas diretas de hidratação de hemoglobina, utilizando uma micro-balança de cristal de quartzo para pesar filmes contendo Hb em variadas saturações de O₂, equilibrados em uma atmosfera com 98% de umidade relativa, Salvay e colaboradores reconfirmaram o valor das 70 moléculas de água envolvidas entre na transição dos extremos conformacionais da proteína (Salvay et al., 2002, 2003). Portanto podemos concluir que o Δn_w medido em solução pelo método de stress osmótico fornece a verdadeira estequiometria das moléculas de água associada com a oxigenação da Hb.

As curvas de equilíbrio de oxigenação da Hb contínuas também possibilitaram a determinação da dependência da constante de associação do primeiro oxigênio à proteína (K_1) com a atividade de água. Da inclinação $d(\ln K_1)/d(\ln a_w)$ quantificamos que a variação de hidratação que acompanha a ligação do primeiro oxigênio à Hb, vale 52 ± 2 moléculas de água. A medida da variação de hidratação associada a K_1 , Δn_{wK_1} , pode ser usada como uma sonda das mudanças estruturais induzidas na proteína pela ligação de O₂. Diversos estudos funcionais, particularmente, medidas do número de prótons liberados pela hemoglobina com a oxigenação (efeito Bohr) têm sugerido que várias pontes salinas existentes na estrutura T_X são quebradas com a ligação do primeiro oxigênio (Perutz, 1970, 1989). Estas pontes salinas podem estar sendo rompidas com a ligação das 52 moléculas de água. Chothia e colaboradores (Lesk et al., 1985) calcularam que a quebra das pontes salinas da Hb expõe uma superfície de aproximadamente 450 Å² ao solvente. Se considerarmos que cada molécula de água cobre aproximadamente de 9 a 10 Å² de superfície, os dados de Chothia e colaboradores sugerem que de 45 a 50 moléculas de água ligam-se à Hb

hemoglobina (Hb). Os valores de Δn_{wK_1} e Δn_{wK_2} estão em concordância

reforçando a sugestão de que a ligação do 1° O_2 é acompanhada pela quebra das pontes salinas existentes na estrutura desoxi (T_X).

5.2 - Efeito da temperatura sobre $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$

Uma questão que surgiu no decorrer deste trabalho está relacionada com o fato dos valores de Δn_w , obtidos tanto para a oxigenação total como para a ligação do primeiro ligante, sofrerem ou não variação no intervalo de temperatura de 10 a 40 $^{\circ}C$.

É descrito na literatura que as conformações da desoxi-Hb e da oxi-Hb não sofrem alterações nas suas respectivas estruturas, dentro de uma variação de temperatura acima citada (Imai & Yonetani, 1975; Imai, 1982), portanto para responder a questão acima; gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ e $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ foram determinados entre 15 e 35 $^{\circ}C$. Os resultados apresentam um paralelismo entre os ajustes lineares aplicados aos pontos experimentais obtidos em cada condição do ensaio. Estes valores das variações de hidratação associados a oxigenação da hemoglobina demonstram que as conformações da desoxi e da oxi-Hb não são alteradas pela variação da temperatura no intervalo investigado, visto que, dentro do erro experimental, $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ são constantes.

A entalpia e entropia de oxigenação em diferentes atividades de água foram determinadas utilizando o conjunto de dados experimentais, apresentados nas figuras 16 e 17. Gráficos de van't Hoff ($\ln P_{50}$ versus $1/T$ e $\ln K_1$ versus $1/T$) foram montados e a inclinação do ajuste linear aplicado aos pontos experimentais fornece o calor cujo valor médio de $-10,57 \pm 0,50$ kcal/mol.heme corresponde à oxigenação total da Hb (ΔH_{P50}) e $-19,12 \pm 0,80$ kcal/mol. O_2 é associado à ligação do primeiro ligante à hemoglobina (ΔH_{K1}). Os valores de ΔH_{P50} e ΔH_{K1} , estão em concordância



com resultados anteriormente descritos (Benesch et al., 1969; Imai, 1979, Bucci et al., 1991; Johnson et al., 1992) além de serem constantes no intervalo de a_w e de temperatura investigados.

A independência de ΔH de oxigenação com a temperatura, como mostrado no anexo A desta tese, indica que a variação da capacidade térmica (ΔC_p) associada à reação de oxigenação é próxima de zero e que as estruturas da oxi e desoxi-Hb, no intervalo de temperatura investigado são invariantes. Esta conclusão é consistente com dados anteriormente publicados (Imai & Yonetani, 1975; Imai, 1982). Por sua vez, a independência das variações de entalpia de oxigenação total e de K_1 com a atividade de água evidencia a ausência de interação direta entre a proteína e o soluto neutro.

A relação $d\Delta H/d\mu_w = 0$ leva à interpretação de que o efeito da atividade de água sobre a variação de energia livre de Gibbs que acompanha a transição de $T_X \rightarrow R$ (ΔG_{P50}) e a associação do 1º ligante à Hb (ΔG_{K1}) são basicamente entrópicos. Conclusão esta baseada no fato de que a diminuição da atividade de água, a_w , leva à $d\Delta S < 0$ e $d\Delta G > 0$, que reflete na transferência de 72 ± 3 e 52 ± 2 moléculas de água do volume da solução para a superfície protéica exposta pela Hb durante sua oxigenação total e com a ligação do primeiro ligante, respectivamente. Além disso, sabe-se que as pontes salinas que estabilizam a estrutura desoxi (T_X) da Hb (Perutz, 1970, 1989) são quebradas e expostas ao solvente, durante a oxigenação da proteína, conseqüentemente a mudança conformacional de desoxi para oxi-Hb é termodinamicamente desfavorável ($\Delta S < 0$) (Bucci et al., 1991, 1993, 1998).

5.3 - Influência da concentração do íon cloreto nos valores de Δn_w de oxigenação total da hemoglobina e de ligação do primeiro O_2 à Hb.

Agora passaremos a discutir o efeito que a concentração de NaCl exerce sobre os parâmetros funcionais e termodinâmicos que estão associados a reação de oxigenação da hemoglobina. Os primeiros trabalhos realizados, seguindo esta linha de pesquisa, mostraram que, em concentrações de ânions próximas das condições fisiológicas, a transição do estado desoxi-Hb para o oxi-Hb é acompanhada pela ligação de aproximadamente 70 moléculas de água (Colombo et al., 1992, 1994, 1996). Mais recentemente, foi mostrado que a mudança de hidratação associada à oxigenação da Hb é modulada pela ligação preferencial de diferentes ânions a desoxi-Hb (Colombo & Seixas, 1999). A ligação de cloreto e fosfato orgânicos, entre outros, à estrutura desoxigenada da Hb leva esta proteína a uma desidratação de aproximadamente 45-50 moléculas de água e a diminuição da afinidade intrínseca por O_2 neste estado. Como consequência, o número de moléculas de água associada à transição do estado totalmente desoxigenado da Hb humana para o totalmente oxigenado varia significativamente de 25 moléculas de água em experimentos realizados na ausência total de Cl^- , para aproximadamente 72 moléculas de água em experimentos realizados em concentração maior que 50 mM de NaCl (Colombo & Seixas, 1999).

A proposição da coexistência da desoxi-Hb em dois estados alostéricos de diferentes afinidades por O_2 (Colombo & Seixas, 1999) foi posteriormente confirmada por experimentos de ligação de O_2 em Hb encapsuladas em sílica-gel (Bruno et al., 2001; Shibayama & Saigo, 2001).

Neste estudo investigamos o efeito de Cl^- sobre a variação de hidratação associada a ligação de O_2 ao primeiro sítio heme da Hb, $\Delta n_{w(KI)}$. Os resultados aqui apresentados são os primeiros que revelam que, assim

como a variação de hidratação que acompanha a oxigenação total, os valores de $\Delta n_{w(K1)}$ em baixa concentração salina (< 1 mM) e acima de aproximadamente 50 mM de NaCl, permanecem com valores constantes médios de $26 \pm 0,2$ e $53 \pm 0,3$ moléculas de água, respectivamente. Consequentemente, a interação do íon cloreto a desoxi-Hb leva a desidratação de aproximadamente 25-27 águas com a ligação da primeira molécula do ligante à proteína. Em concentrações salinas maiores que 50 mM podemos notar que $\cong 70\%$ da variação de hidratação, associada com a oxigenação da Hb ocorre com a ligação do primeiro O_2 , enquanto que, nos experimentos realizados em baixas concentrações de sal a variação de hidratação que acompanha a ligação do 1º O_2 à Hb é idêntica a variação de hidratação associada a transição $T_0 \rightarrow R$, sugerindo que nestas condições toda mudança estrutural sofrida pela Hb, em baixas concentrações de ânions, ocorre com a ligação do primeiro O_2 .

Os valores de $\Delta n_{w(P50)}$ e $\Delta n_{w(K1)}$ à diferentes concentrações de NaCl, à pH alcalino (pH 9,0) também foram determinados. É sabido que a interação de ânions cloreto com a Hb, em pH 7,3, leva a ligação de 1 H^+ extra a estrutura desoxigenada da proteína, consequentemente, com a oxigenação da Hb o número de prótons que são liberados varia de 1, na ausência de cloreto, para aproximadamente 2 na presença de 50 a 200 mM NaCl (Kilmartin et al., 1980, Fronticelli et al., 1994). Uma vez que não ocorre o efeito Bohr em pH acima de 8,5 (Aminiconi, et al., 1981; Bucci & Fronticelli, 1981; Busch et al., 1990), examinamos com estas medidas se a ligação de prótons extras, induzidos, pela associação de Cl^- a Hb teria alguma consequência estrutural que pudesse alterar o valor de Δn_w^{Obs} . A variação de hidratação que acompanha a transição da desoxi-Hb para a oxi-Hb ($\Delta n_{w(P50)}$) e a ligação do primeiro O_2 ($\Delta n_{w(K1)}$) foram determinadas a pH 9,0, tanto na presença quanto na ausência de NaCl, são iguais aos

estimados nas mesmas condições a pH 7,3. Estes resultados mostram que os valores de Δn_w não são afetados por mudanças de pH na região básica.

5.4 - Influência da concentração do íon cloreto na entalpia de oxigenação.

O comportamento do ΔH de oxigenação total e de ΔH associado à ligação do primeiro O_2 , com a concentração de ânions, foi determinado estudando a dependência de $\ln P_{50}$ e $\ln K_1$, respectivamente, com o inverso da temperatura. Analisando os gráficos de van't Hoff, $\ln (P_{50}/P_{50}^0)$ versus $1/T$ e $\ln (K_1/K_1^0)$ versus $1/T$, medidos na ausência de sacarose e em diferentes concentrações de NaCl, verificamos que o aumento na concentração de ânion, aumenta a quantidade de calor liberado com a reação de oxigenação da Hb, tanto para P_{50} quanto para K_1 . O calor de oxigenação total da Hb tem sido estimado entre -10 e -15 kcal/mol.heme, sendo que esta variação é dependente da composição e da entalpia de ionização dos diferentes tipos de tampão utilizados nestas determinações (Aminiconi et al., 1981; Imai, 1982).

Neste trabalho obtivemos um $\Delta H = -10,65 \pm 0,41$ kcal/mol.heme para oxigenação total da Hb ($-42,60 \pm 0,82$ kcal/mol.Hb) e um $\Delta H = -19,53 \pm 1,00$ kcal/mol. O_2 para a ligação do 1º ligante. Estes valores, que se referem à valores na presença saturante de NaCl são compatíveis com os valores de ΔH publicados em condições semelhantes, como mostra a tabela a seguir.

Condição Experimental	ΔH (kcal/mol.heme)	Referência
0,01 M Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,3, 25 °C.	$\Delta H_{P50} = -10,65 \pm 0,41$ $\Delta H_{K1} = -19,53 \pm 1,00$	Resultado do autor
0,05 M Bis-tris, pH 7,3, 25 °C.	$\Delta H_{P50} = -13,7 \pm 0,1$	Benesch et al., 1969.
0,1M Tris, pH 7,5, 20 °C.	$\Delta H_{P50}^* = -14 \pm 0,4$	Atha et al., 1974.
0,05 M Bis-tris, pH 7,4, 100 mM Cl ⁻ , 25 °C.	$\Delta H_{P50} = -12,5 \pm 0,3$ $\Delta H_{K1} = -9,7 \pm 0,4$	Imai et al., 1975.
0,05 M Bis-tris, pH 7,4, 100 mM Cl ⁻ .	$\Delta H_{P50} = -14,4 \pm 0,1$ $\Delta H_{K1} = -12,3 \pm 0,1$	Imai et al., 1979.
0,1M Tris, 100 mM, pH 7,4, 25 °C.	$\Delta H_{P50} = -14,2 \pm 0,6$	Mills et al., 1979.
0,1M Tris, 100 mM, pH 7,4, 25 °C.	$\Delta H_{P50}^* = -14,9 \pm 0,6$	Mills et al., 1979.
Água, 0,01 M NaCl, pH 7,0.	$\Delta H_{P50} = -16,9 \pm 0,17$	Aminiconi et al., 1981.
Água, 0,1 M NaCl, pH 7,0.	$\Delta H_{P50} = -15,3 \pm 0,15$	Aminiconi et al., 1981.
0,05 M Bis-Tris, pH 7,4, 100 mM Cl ⁻ , 25 °C.	$\Delta H_{P50} = -12,3 \pm 0,12$	Imai, 1982.
0,1 M Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4.	$\Delta H_{P50} = -11,7 \pm 0,3$	Doyle et al., 1989.
0,1 M Fosfato, 100 mM Cl ⁻ , pH 7,33.	$\Delta H_{P50}^* = -14,4 \pm 0,3$	Razynska et al., 1990.
0,01 M Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,3.	$\Delta H_{P50} = -11,0 \pm 0,15$	Coletta et al., 1992.
0,1 M Fosfato, 1 mM EDTA, pH 7,6.	$\Delta H_{P50}^* = -12,0 \pm 0,15$ $\Delta H_{K1} = -10,3 \pm 1,1$	Johnson et al., 1992.

Tabela 14: Comparação entre os valores de ΔH obtidos em nossos experimentos e os valores publicados. (*) São valores de ΔH obtidos por calorimetria.

Na ausência de NaCl e outros ânions, os valores encontrados de ΔH_{P50} e ΔH_{K1} foram de $-3,37 \pm 0,36$ kcal/mol.heme e $-3,30 \pm 0,82$ kcal/mol de O₂, respectivamente. Com o aumento da concentração de Cl⁻, o calor liberado com a oxigenação total da Hb aumenta até atingir os os patamares de $-10,98 \pm 0,30$ kcal/mol.heme e $-19,71 \pm 0,30$ kcal/mol de O₂.

Esta dependência de ΔH com a atividade do íon cloreto foi ajustada com a equação 54, que resulta do modelo de três estados para a oxigenação da Hb. O bom ajuste dos dados experimentais com este modelo é uma

evidência extra, que dá suporte à proposição da existência de dois estados alostéricos T distintos.

$$\Delta H^{\text{Obs}} = \frac{(\delta H - \Delta H)}{1 + \left(\frac{X}{K_X}\right)^n} + \Delta H$$

Nesta equação, que descreve a dependência do ΔH^{Obs} com a concentração de ânions livres na solução, δH e ΔH correspondem a variação de entalpia devido a transição entre os estados oxi-R e desoxi- T_0 e entre oxi-R e desoxi- T_X , respectivamente, K_X é a constante de ligação de Cl^- ao estado T, e n a estequiometria de ligação.

A dependência do ΔS^{Obs} de oxigenação com a concentração de NaCl, também foi muito bem ajustada pela equação 55, que foi escrita em termos da variação de entropia de oxigenação, onde de maneira análoga à variação de hidratação e entalpia, o δS e ΔS representam a variação de entropia intrínseca da transição $T_0 \rightarrow R$ e $T_X \rightarrow R$, respectivamente.

5.5 – Correlação entre Δn_w , ΔH e ΔS de oxigenação.

Um resultado inesperado foi encontrar que os parâmetros de ligação do ânion cloreto a desoxi-Hb (transição do estado T_0 para o T_X) determinados na dependência de ΔH^{Obs} e Δn_w^{Obs} com $\log(\text{Cl}^-)$ são dentro do erro experimental idênticos. Estes resultados implicam que as mudanças estruturais induzidas pela ligação do íon cloreto a desoxi-Hb, são a causa principal das variações de hidratação, calor e entropia de oxigenação observados com a hemoglobina humana.

Nossa análise da correlação entre Δn_w e ΔH teve por base a análise dos termos que contribuem para a entalpia de ligação de oxigênio a

hemoglobina. A equação 53 demonstra que para cada condição experimental a variação de entalpia observada é dada por:

$$\Delta H^{\text{Obs}} = \Delta H_{\text{O}_2} + \Delta H_{\text{conf.}} + \Delta n_w \cdot \Delta H_w + \sum_i \Delta n_i \cdot \Delta H_i$$

onde ΔH_{O_2} é o calor intrínseco de oxigenação do grupo heme, $\Delta H_{\text{conf.}}$ é o calor associado a variação alostérica conformacional da estrutura da Hb induzida pela ligação de um ligante em determinada condição experimental. $\Delta n_i = n_i^{\text{oxi}} - n_i^{\text{desoxi}}$ é a diferença no número de ligantes heterotrópicos ($i = \text{H}^+, \text{Cl}^-, \text{H}_2\text{O}$) ligados entre a desoxi-Hb e a oxi-Hb, e ΔH_i é o calor intrínseco de ligação do ligante i . Nesta equação Δn_w e ΔH_w são mantidos em destaque das demais contribuições para enfatizar que a soma $(\Delta H_{\text{conf.}} + \Delta n_w \cdot \Delta H_w)$ representa o calor de solvatação. De acordo com a equação acima, a variação de entalpia de oxigenação da Hb pode ser afetada diretamente pela concentração de Cl^- , via calor intrínseco de ligação do ânion $(\Delta n_{\text{Cl}^-} \cdot \Delta H_{\text{Cl}^-})$, e indiretamente, via variações da conformação e hidratação da Hb $(\Delta H_{\text{conf.}} + \Delta n_w \cdot \Delta H_w)$. É bem descrito na literatura que com a ligação de O_2 à Hb, em pH 7,3, o número de H^+ que são liberados por esta proteína varia de 1, na ausência de cloreto, para $\cong 2$ na presença de 50 mM a 200 mM de NaCl (Antonini et al., 1965, Kilmartin et al., 1980, Fronticelli et al., 1994). Apesar de ter sido reportado que a variação da liberação de H^+ não contribui para o ΔH de oxigenação em pH na região alcalina, devido a ausência do efeito Bohr (Aminiconi, et al., 1981; Bucci & Fronticelli, 1981; Busch & Ho, 1990), verificamos se a ligação de um próton extra, induzida pela associação de Cl^- à Hb, refletiria no valor do ΔH^{Obs} . A variação de entalpia associada a transição do estado oxigenado para o estado oxigenado (ΔH_{P50}) e a ligação do primeiro O_2 à proteína (ΔH_K) foram determinadas em pH 9,0, tanto na presença quanto

na ausência de NaCl. Dentro do erro experimental, os valores de ΔH medidos em pH 9,0 são os mesmos que os estimados nas mesmas condições e em pH 7,3. Este resultado confirma que a liberação de H^+ , com a oxigenação da Hb, não contribui para o ΔH^{Obs} .

O fato dos ajustes aplicados aos dados experimentais que descrevem a dependência do ΔH^{Obs} de oxigenação sobre $[Cl^-]$ (fig. 30), comportar-se semelhantemente ao ajuste que descreve a dependência de Δn_w^{Obs} com a $[NaCl]$ (fig. 26), sugere que a ligação do íon cloreto a desoxi-Hb influencia exatamente da mesma maneira a variação de hidratação e entalpia de oxigenação, levando-nos a propor que apenas o calor de solvatação ($\Delta H_{conf} + \Delta n_w \cdot \Delta H_w$) exerce influência sobre o ΔH de oxigenação, medido em diversas $[NaCl]$. Para mostrar esta contribuição determinamos o comportamento de ΔH^{Obs} versus Δn_w^{Obs} , onde se pode notar a correlação linear entre estes parâmetros. O intercepto da regressão linear dos pontos experimentais, dentro do erro experimental, é próximo de zero. Isto primeiramente sugere que o calor de ligação de Cl^- a desoxi-Hb é também aproximadamente zero. Embora o mecanismo de interação dos íons cloretos a desoxi-Hb permaneça desconhecido este resultado é consistente com a proposta de que esta interação ocorra via condensação de cargas (Perutz & Shih, 1994; Perutz et al., 1998). Proposição esta que reforçada se observarmos figura na 30 que o ΔH de oxigenação permanece constante em $[NaCl]$ acima de 50 mM. A última e possível contribuição para a entalpia de van't Hoff de oxigenação seria o calor de ligação de prótons, liberados pela proteína, ao tampão Hepes, mas como ajustamos o pH da solução na temperatura do experimento, esta contribuição é nula.

Com isso, concluímos que durante a ligação do O_2 ao grupo heme a transferência de grupos da Hb para a sua superfície e a subsequente hidratação dos mesmos é o único termo que contribui para o ΔH^{Obs} . Em

outras palavras, desde que não haja qualquer outra contribuição de calor para o ΔH^{Obs} a inclinação de ΔH^{Obs} versus Δn_w^{Obs} representa apenas o valor do calor de solvatação da superfície exposta pela proteína em solução aquosa. Logo, o melhor ajuste linear para este gráfico equivale a $\delta H_w = -0,63 \pm 0,07 \text{ kcal/mol H}_2\text{O}$.

O mesmo tratamento de dados foi feito para os pontos que compõem o gráfico de $T\Delta S^{\text{Obs}}$ x Δn_w . A inclinação deste gráfico fornece um $\delta S_w = -2,4 \pm 0,1 \text{ cal/mol.H}_2\text{O.K}$ que corresponde a variação de entropia associada com a hidratação. Contudo, este valor pode subestimar o valor real da variação de hidratação. Apesar dos calores de ligação de H^+ e Cl^- serem aproximadamente zero, as variações de entropia não são, já que as variações de energia livre de oxigenação, ΔG^{Obs} , variam para cada atividade de Cl^- e H^+ . Uma vez que, ΔS^{Obs} é definido por $[-(\Delta G^{\text{Obs}} - \Delta H^{\text{Obs}}/T)]$ e que a ligação das moléculas de H_2O sobre a transição $T_X \rightarrow T_0$ é acompanhada pela liberação de $\cong 1\text{H}^+$ e $\cong 2\text{Cl}^-$, o valor acima para δS_w parece representar apenas um valor menor que a estimativa do valor verdadeiro de ΔS calculado para fixar uma molécula de água na superfície da proteína em solução.

A partir dos valores de δH_w e δS_w determinados, em temperatura ambiente, o valor da energia livre associada com a transferência e hidratação de grupos que são expostos durante a oxigenação, δG_w , vale $\cong 100 \text{ cal/mol.H}_2\text{O}$, concordando portanto, com os dados obtidos por experimentos de transferência de grupos químicos de líquidos hidrofílicos para a água (Eisenberg & McLachlan, 1986; Juffer et al., 1995)

O mesmo tratamento foi realizado para os dados apresentados na figura 34, onde verificamos a equivalência do efeito de cloreto sobre as variações de hidratação, entalpia e entropia que acompanha a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb. Das inclinações dos ajustes lineares

aplicados aos pontos experimentais estimamos $-0,61 \pm 0,03$ kcal/mol H_2O e $-0,65 \pm 0,04$ kcal/mol H_2O ($= -2,18$ cal/mol.K), que representam o custo entálpico e entrópico para transferir um mol de moléculas de água do volume da solução para a superfície exposta da proteína com a ligação do primeiro O_2 . O δG_w associado à hidratação da superfície exposta pela proteína com a ligação do 1°O_2 , vale aproximadamente 40 cal/mol. H_2O .

Este conjunto de dados representa a primeira determinação direta da variação de entalpia, δH_w , e entropia, δS_w , associadas com a exposição de grupos internos para a superfície exposta ao solvente de uma proteína em meio aquoso. Os valores de δS_w , determinados neste trabalho, para a oxigenação total e para K_1 correspondem respectivamente a $-2,4$ cal/mol.K e $-2,18$ cal/mol.K, e estão de acordo com o custo entrópico para transferir um mol de moléculas de água do líquido para a superfície da proteína e que foi avaliado entre 0 e -7 cal/mol.K, por Dunitz, a partir de dados de entropia padrão de hidratação de sais anidros e hidratados (Dunitz, 1994).

5.6 – Relação entre os valores de entalpia e entropia de hidratação determinados neste trabalho com outros dados da literatura.

Os valores energéticos de solvatação existente na literatura foram estimados a partir de experimentos modelo de transferência de pequenas moléculas do meio apolar para a água. Normalmente estes valores são relacionados à área de superfície exposta ao solvente destas moléculas. De tais dados, é bem documentado que a energia livre de transferência de grupos hidrofóbicos de líquidos não polares para a água apresenta valores médios entre $16 - 35$ cal/mol. $\text{\AA}^2$ (Eisenberg & McLachlan, 1986; Juffer et al., 1995). Considerando que uma molécula de água cobre uma área de $\cong 10 \text{\AA}^2$, o valor quantificado neste trabalho para a variação da energia livre

de solvatação por molécula de água de $\cong 100$ cal/mol.H₂O à 25 °C, é consistente com as estimativas da literatura.

A questão que gostaríamos de abordar é se os valores de δG_w , δS_w e δH_w , determinados neste estudo, apresentam características hidrofóbicas, hidrofílicas ou uma mistura destas duas.

Para responder esta questão comparamos, via gráficos de compensação, os valores observados das variações de entalpia e entropia de oxigenação da Hb, ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} , com os valores da entalpia e entropia de transferência de pequenos grupos químicos de líquidos hidrofóbicos (ou fase gasosa) para água, $\Delta H_{Transf.}$ e $\Delta S_{Transf.}$ (Makhatadze & Privalov, 1993; Privalov & Makhatadze, 1993; Oobatake & Ooi, 1988; Ooi et al., 1987; Murphy, 1994; Baldwin, 1986), como mostra as figuras 36(a) e 36(b). De acordo com o gráfico apresentado na fig. 36(a), as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrofóbicos para a água estão localizadas próximas e paralelas da linha de compensação definida pelos valores experimentais de ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} , determinados neste trabalho. Este resultado sugere fortemente que as mudanças em ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} são geralmente dominadas por hidratação com característica hidrofóbica. O gráfico apresentado na figura 36(b) sustenta esta interpretação, pois, em discrepância com os dados mostrados na figura 36(a), as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrófilos para a água estão bastante espalhadas e localizadas abaixo da linha de compensação. Esta conclusão é reforçada pela magnitude e sinal de δH_w e δS_w . Os sinais mostram que, enquanto a mudança estrutural da Hb para a estrutura de maior superfície exposta ao solvente é favorecida entalpicamente, $\delta H_w < 0$, ela é desfavorável entropicamente, $\delta S_w < 0$. Como mostrado, primeiramente, por W. Kauzmann (Kauzmann, 1959) tal distinção entre



uma energia favorável e uma entropia desfavorável de grupos transferidos para água, representam características hidrofóbicas.

Este interessante resultado nos leva a conclusão que as variações de entalpia e entropia associadas com as mudanças conformacionais da Hb são dominadas pela energética de hidratação, que tem características típicas à de hidratação de grupos hidrofóbicos. Esta conclusão não implica, entretanto, em outra, a de que os novos sítios de hidratação expostos ao solvente são exclusivamente grupos hidrofóbicos.

Finalmente nos perguntamos se os valores de entalpia, δH_w , e entropia, δS_w , de solvatação por mol de molécula de água, determinados neste trabalho, podem ser utilizados para quantificar as variações de entalpia e entropia de outras reações protéicas nas quais as variações de hidratação são conhecidas. Se isto for possível, poderíamos estabelecer uma correlação entre o mecanismo estrutural e o funcional destas proteínas. Para este teste consideramos a reação de oxigenação da Hb homodimérica de *Scapharca inaequivalvis* (HbI). A HbI liga cooperativamente duas moléculas de oxigênio e a variação de entalpia (ΔH_i) e entropia (ΔS_i) desta ligação em cada passo da reação foram determinadas por Ikeda-Saito e colaboradores (Ikeda-Saito et al., 1983). Consequentemente, o ganho de energia cooperativa sobre a ligação do segundo ligante pode ser determinado pela diferença entre o ΔH_i e o ΔS_i entre os consecutivos passos. Considerando os valores reportados por Ikeda-Saito (1983), $\Delta\Delta H_i = \Delta H_1 - \Delta H_2 = +4$ Kcal/mol e $\Delta\Delta S_i = \Delta S_1 - \Delta S_2 = +17$ cal/mol.K. A variação de hidratação associada a oxigenação da HbI é também conhecida, pois através de experimentos de estresse osmótico foi determinado que $\cong 6$ moléculas de água são liberadas após a ligação de O_2 à HbI (Chiancone & Boffi, 2000). Com estes valores, Chiancone e Boffi tentaram estimar a contribuição da energia de ligação de O_2 associada a hidratação da proteína

ao comportamento cooperativo da Hb. Porém, a falta de estimativas precisas de entropia e entalpia de hidratação os levou a figuras inconclusivas (Chiancone & Boffi, 2000). Agora, usando a entalpia e entropia de ligação de água, $-0.63 \text{ kcal/mol.H}_2\text{O}$ e $-2,4 \text{ cal.}/(\text{mol.H}_2\text{O}).\text{K}$, respectivamente, determinadas neste trabalho, e sabendo que 6 moléculas de água são liberadas com a oxigenação da Hb homodimérica, encontramos que a contribuição da hidratação para o controle alostérico desta Hb corresponde a $+3,8 \text{ kcal/mol}$ em entalpia e $\cong +14,4 \text{ cal/mol.K}$ em entropia. Estes valores, dentro do erro experimental, estão em acordo com as $+4 \text{ kcal/mol}$ em entalpia e $+18 \text{ cal/mol.K}$ em entropia que foram determinadas (Ikeda-Saito et al., 1983). Este exemplo ilustra, que os valores de δH_w e δS_w por nós determinados, podem proporcionar previsões bastante boas a respeito da contribuição da solvatação associada a reatividade e controle alostérico da proteína.

A partir do conjunto de resultados apresentados e discutidos neste texto, encerramos comentando que este trabalho descreve, originalmente, uma estratégia experimental que permite a determinação da energética de solvatação associada a reação de oxigenação da hemoglobina em solução. Os parâmetros energéticos de solvatação aqui determinados são referentes àqueles que acompanham a mudança de conformação e hidratação entre dois estados nativos de uma proteína. Ainda não sabemos se estes parâmetros de energia de solvatação podem estar associados a reações que envolvem outros níveis de organização estrutural, tal como o enovelamento da proteína. Diferente da transição entre dois estado globulares, o enovelamento/desenovelamento da macromolécula é caracterizado por grandes mudanças estruturais, à nível secundário e terciário. Consequentemente, a descoberta dos valores realísticos de energia para a transferência e hidratação de grupos hidrófilicos, tais como grupos $-\text{C}=\text{O}$ e $-\text{NH}$, juntamente com os valores termodinâmicos calculados neste

trabalho, certamente serão necessários para a melhor avaliação da contribuição termodinâmica da água para a estabilidade e reatividade da proteína. A estratégia experimental apresentada neste estudo, que envolve o método do estresse osmótico, uma técnica analítica que usa solutos neutros para quantificar as mudanças na ligação de água associadas a reações bioquímicas em solução (Colombo et al., 1992), certamente facilitará a determinação experimental da contribuição realística energética sobre hidratação com característica hidrofóbica ou hidrofílica de qualquer processo bioquímico.

6 - CONCLUSÕES



Os resultados, de aqui, obtidos permitem concluir que:

a) Os valores da variação de hidratação durante a transição $T_X \rightarrow R$, $\Delta n_{H_2O, T_X \rightarrow R}$ e da variação de hidratação por T_X , $\Delta n_{H_2O, T_X}$, foram medidos em uma única temperatura e os dados mostram que, dentro de um erro experimental, tanto $\Delta n_{H_2O, T_X \rightarrow R}$ como $\Delta n_{H_2O, T_X}$ independem da temperatura. Isso é um resultado esperado se considerarmos que as contribuições da desidratação e da oxigenação de T_X são independentes da temperatura no intervalo investigado.

b) A independência da variação de entalpia de oxigenação total e de R_X para com a atividade de água da solução experimental, permite aos autores concluir que o efeito de P_{H_2O} quanto à R_X apresenta caráter basicamente entrópico.

6 - CONCLUSÕES

a) Com o decréscimo de T_X , a variação de entalpia de oxigenação é negativa reduzindo, portanto, a perda de 72 ± 3 e 52 ± 2 moléculas de água de hidratação 1 ± 1 e 1 ± 1 moléculas de água de hidratação por molécula de T_X que são independentes da atividade da solução para a superfície exposta pela T_X durante a oxigenação total e com a ligação de primeira molécula de líquido, respectivamente.

b) Assim como as variações de hidratação, as de entalpia e entropia de oxigenação de T_X são independentes da atividade de água. Possibilita-se assim a proposição de que as variações de entalpia e entropia de oxigenação de T_X durante a ligação de O_2 e moléculas de água independem da temperatura e são as principais responsáveis pela variação de calor de oxigenação da T_X .

Os resultados, até aqui, obtidos permitem concluir que :

a) Os valores da variação de hidratação durante a transição $T_X \rightarrow R$, $\Delta n_{w(P50)}$ e da variação de hidratação para K_1 , $\Delta n_{w(K1)}$, foram medidos em cinco temperaturas e os dados mostram que, dentro de um erro experimental, tanto $\Delta n_{w(P50)}$ como $\Delta n_{w(K1)}$ independem da temperatura. Este é um resultado esperado se considerarmos que as conformações da desoxi e da oxi-Hb não são alteradas pela variação da temperatura no intervalo investigado.

b) A independência da variação de entalpia de oxigenação total e de K_1 para com a atividade de água da solução experimental, permite-nos concluir que o efeito de Δn_w sobre o ΔG de oxigenação (tanto de P_{50} quanto de K_1) apresenta caráter basicamente entrópico.

c) Com o decréscimo de a_w , a variação da entropia de oxigenação é negativa refletindo, portanto, a perda de 72 ± 3 e 52 ± 2 moléculas de água que são transferidas do volume da solução para a superfície exposta pela Hb durante a oxigenação total e com a ligação da primeira molécula do ligante, respectivamente.

d) Assim como as variações de hidratação, as de entalpia e entropia que acompanham a oxigenação da Hb, são igualmente dependentes da atividade de cloreto. Possibilitando assim, a proposição de que as variações na conformação e hidratação da Hb induzidas pela ligação de O_2 e modulada pelas interações do íon cloreto são os principais responsáveis pela variação de calor de oxigenação da Hb.



e) As dependências de Δn_w^{Obs} , ΔH^{Obs} e ΔS^{Obs} com a concentração de NaCl, mostraram-se idênticas tanto para os experimentos realizados em pH 7,3, quanto para os obtidos em pH 9,0. Este resultado leva a conclusão de que a variação de calor e entropia por mol de molécula de água, não apresenta contribuição da ligação de H^+ .

f) O presente trabalho apresenta a primeira determinação experimental da energética da solvatação de uma proteína, isto é, a energia necessária para transferir grupos do interior da proteína para o solvente e hidrata-los. Estes valores são:

-) $\delta H_w = -0,63$ kcal/mol de H_2O e $\delta S_w = -2,40$ cal/K mol de H_2O , para a oxigenação total, a 298K.

-) $\delta H_w = -0,61$ kcal/mol de H_2O e $\delta S_w = -2,18$ cal/K mol de H_2O , a 298K, para a ligação do $1^0 O_2$ à Hb.

BIBLIOGRÁFICAS



ACKERS, G. K. Hydrolysis of human hemoglobin and oxygen binding in human hemoglobin. *Biochim. J.*, v. 59, n. 2, p. 331-334, 1963.

ACKERS, G. K. Molecular structure of human hemoglobin. *Biochim. J.*, v. 59, n. 2, p. 335-338, 1963.

ADAMS, G. J. The hemoglobin system. IV. The oxygen-dissociation curve of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, p. 529-534, 1964.

ADAMS, G. J. Interaction of hemoglobin with water. Effect on the oxygen-dissociation curve of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, p. 535-538, 1964.

ADAMS, G. J. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. The influence of temperature on the Bohr effect in human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J., ADAMS, G. K. Calorimetric determination of the heat of oxygenation of human hemoglobin as a function of pH and the extent of reaction. *Biochemistry*, v. 12, n. 11, p. 2376-2380, 1973.

ADAMS, G. K., ADAMS, G. J. Hemoglobin. In: *Handbook of Hematology*, 2nd ed., ed. by W. B. Jones, London, 1970, p. 1-10.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ADAMS, G. J. M. Studies on the relation between molecular structure and function of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 1134-1139, 1964.

ACKERS, G. K. Energetics of subunit assembly and ligand binding in human hemoglobin. *Biophys. J.*, v. 80, n. 2, p. 331-346, 1980.

ACKERS, G. K. et al. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*, v. 255, p. 54-62, 1992.

ADAIR, G. S. The hemoglobin system IV. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 63, p. 529-538, 1925.

AMINICONI, G. et al. Interaction of hemoglobin with salts. Effects on functional properties of human hemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 152, p. 111-129, 1981.

ANTONINI, E. et al. Studies on the relations between molecular and function properties of hemoglobin. The influence of temperature on the Bohr effect in human and in horse hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 240, n. 3, p. 1096-1103, 1965.

ATHA, D. H.; ACKERS, G. K. Calorimetric determination of the heat of oxygenation of human hemoglobin as a function of pH and the extent of reaction. *Biochemistry*, v. 13, n. 11, p. 2376-2386, 1974.

ATKINS, P.W. **Físico-química**. Tradução por Horácio Macedo. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 1999. v. 1. Original inglês.

BALDWIN, J. M. A model of cooperative oxygen binding to haemoglobin. *Br. Med. Bull.*, v. 32, n. 3, p. 213-218, 1976.

BALDWIN, J. M. Structure and function of haemoglobin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 29, p. 225-320, 1975.

BALDWIN, R. L. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 83, p. 8069-8072, 1986.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; CHI, I. Y. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ion strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, v. 8, n. 6, p. 2567-2571, 1969.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; YUNG, S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*, v. 55, n. 1, p. 245-248, 1973.

BEVINGTON, P. R.; ROBINSON, D. K. **Data reduction and error analysis for the physical sciences**. 2 ed. Boston: Mc Graw-Hill, 1992.

BRUNO, S., et al. High and low oxygen conformations of oxygenation of T state hemoglobin. *Protein Science*, v. 10, n. 11, p. 2401-2407, 2001.

BUCCI, E.; FRONTICELLI, C. Measurement of Bohr effect: dependence on pH of oxygen affinity hemoglobin. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 523-533, 1981.



BUCCI, E. et al. Effect of intramolecular cross-links on the enthalpy and quaternary structure of intermediates of oxygenation of human hemoglobin. *Biochemistry*, v. 32, p. 3519-3526, 1993.

BUCCI, E. et al. Entropy-driven intermediate steps of oxygenation may regulate the allosteric behavior of hemoglobin. *Biophys. J.*; v. 74, p. 2638-2648, 1998.

BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; GRZYCZYNSKI, Z. Discontinuous release of heat at successive steps of oxygenation in human and bovine hemoglobin at pH 9.0. *Biochemistry*, v. 30, p. 3195-3199, 1991.

BUSCH, M. R.; HO, C. E. Effect the anions on the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin. *Biophys. Chem.*; v. 37, n. 1, p. 313-322, 1990.

CABANI, S. et al. Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *J. Sol. Chem.*; v. 10, p.563-595, 1981. apud MURPHY, K. P. Hydration and convergence temperatures: on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys. Chem.*; v. 51, p. 311-326, 1994.

CABANI, S. et al. Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *J. Sol. Chem.*; v. 10, p.563-595, 1981. apud OOI, T.; et al. Accessible surface areas as a measure of thermodynamic of hydration of peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 3086-3090, 1987.

CAÔN FILHO, O. **Determinação das curvas de equilíbrio de ligação de oxigênio a hemoglobinas em soluções viscosas usando uma cela espectropolarimétrica modificada.** 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

CASTRO, O. A. **Influência da concentração do íon cloreto no efeito Bohr da hemoglobina humana A₀.** 1999. 86 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

CHAIRES, J. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. *Biophys. Chem.*, v. 64, p. 15-23, 1997.

CHIANCONE, E.; BOFFI, A. Structural and thermodynamic aspects of cooperativity in the homodimeric hemoglobin from *Scapharca inaequivalvis*. *Biophys. Chem.*, v. 586, p. 173-178, 2000.

CHOTHIA, C.; WODAK, S.; JANIN, J. Role of subunit interfaces in the allosteric mechanism of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 73, n. 11, p.3793-3797, 1976.

CHU, A. M.; TURNER, B. W.; ACKERS, G. K. Effects of proton on the oxygenation - linked subunit assembly in human hemoglobin. *Biochemistry*, v. 23, p. 604-617, 1984.

COLETTA, M. et al. A comparative study of the temperature dependence of the oxygen-binding properties of mammalian hemoglobins. *Eur. J. Biochem.*, v. 204, p. 1155-1157, 1992.



COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSESIAN, V. A. Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allosterism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p.1 0517-10520, 1994.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 9, p. 4895-4899, 1996.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSESIAN, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, v. 256, p. 655-659, 1992.

COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V. Novel allosteric conformation of human Hb revealed by the hydration and anion effects on O₂ binding. *Biochemistry*, v. 38, n. 36, p. 11741-11748, 1999.

DEC, S. F.; GILL, S. J. Heats of solution of gaseous hydrocarbons in water at 15-degree-C, 25-degree-C and 35-degree-C. *J. Sol. Chem.*, v. 14, p. 827-836, 1985. apud MURPHY, K. P. Hydration and convergence temperatures: on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys. Chem.*, v. 51, p. 311-326, 1994.

DOYLE, M.L.; HENSLEY, P. Tight ligand binding affinities determined from thermodynamic linkage to temperature by titration calorimetry. *Methods Enzymol.*, v. 295, p. 88-99, 1998.

DOYLE, M. L. et al. Temperature- and pH-dependence of the oxygen-binding reaction of human fetal haemoglobin. *Biochem. J.*, v. 260, p. 617-619, 1989.

DUNITZ, J. D. The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science*, v. 264, p. 876, 1994.

EATON, W. E.; HENRY, E. R.; HOFRICHTER, J. Application of linear free energy relations to protein conformational changes: The quaternary structural change of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 88, p. 4472-4475, 1991.

EATON, W.E. et al. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin: really understood ? *Nat. Struct. Biol.*, v. 6, n. 4, p. 351-358, 1999.

EISENBERG, D.; McLACHLAN, A. D. Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*, v. 319, p. 199-203, 1986.

FAGO, A.; WELLS, R. M. G.; WEBER, R. E. Temperature – dependent enthalpy of oxygenation in antarctic fish hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 118B, n. 2, p. 319-326, 1997.

FRANK, H. S.; EVANS, M. W. Free volume and entropy in condensed systems. 3. Entropy in binary liquid mixtures – Partial molal entropy in dilute solutions – Structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J. Chem. Phys.*, v. 13, n. 11, p. 827-836, 1945.



FRONTICELLI, C. et al. Chloride ion independence of the Bohr effect in a mutant human hemoglobin β (V1M+H2 deleted). *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 39, p. 23965-23969, 1994.

GARRETT, R. H.; GRISHLAM, C. M. **Biochemistry**: Enzyme specificity and allosteric regulation. Orlando: Saunders College Publishing, 1995. p.387-423.

GIARDINA, B.; AMICONI, G. Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobins by conventional spectrophotometric procedures. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 417-438, 1981.

GILL, S. J.; NICHOLS, N. F.; WADSÖ, I. Calorimetric determination of enthalpies of solution of slightly solute liquids. Application to benzene in water. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 8, p. 445-452, 1976. apud BALDWIN, R. L. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 83, p. 8069-8072, 1986.

GÓMEZ, J. et al. The heat capacity of proteins. *Protein Sci.*, v. 22, p. 404-412, 1995.

HAIRE, R. E.; HEDLUND, B. E. Hemoglobin function in the water-ethylene glycol cosolvent system; linkage between oxygen binding and hydration. *Biochemistry*, v. 22, p. 327-334, 1983.

IKEDA-SAITO, M. et al. Thermodynamic properties of oxygen equilibria of dimeric and tetrameric hemoglobins from *Scapharca inaequivalvis*. *J. Mol. Biol.*, v. 170, p. 1009-1018, 1983.

IMAI, K. Adair fitting to oxygen equilibrium curves of hemoglobin. *Methods Enzymol.*, v. 62, n. 16, p. 559-577, 1994.

IMAI, K. Precision determination and Adair scheme analysis of oxygen equilibrium curves of concentrated hemoglobin solution: A strict examination of Adair constant evaluation methods. *Biophys Chem.*, v. 37, p. 197-210, 1990.

IMAI, K. **Allosteric effects in haemoglobin**. Cambridge: University Cambridge Press, 1982.

IMAI, K. Analysis of ligand binding equilibria. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 470-486, 1981.

IMAI, K. Measurement of accurate oxygen equilibria curves by an automatic oxygenation apparatus. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 438-449, 1981.

IMAI, K. Thermodynamic aspects of the cooperativity in four-step oxygenation equilibria of haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 133, p. 233-247, 1979.

IMAI, K.; YONETANI, T. Thermodynamical studies of oxygen equilibrium of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 250, n. 18, p. 7093-7098, 1975.



IMAIZUMI, K.; IMAI, K.; TYUMA, I.; The linkage between the four-Step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin. *J. Biochem.*, v.86, p. 1829-1840, 1979.

INSTRUCTIONS for YSI 5331 Oxygen probe-YSI. Ohio Yellow Springs Instruments, 2p.

JOHNSON, C. R.; GILL, S. J.; PETERS, K. S. Thin-layer microcalorimetric studies of oxygen and carbon monoxide to hemoglobin and myoglobin. *Biophys. Chem.*, v. 45, p. 7-15, 1992.

JOHNSON, C. R. et al. Oxygen binding constants and stepwise enthalpies for human and bovine hemoglobin at pH 7.6. *Biochemistry*. v. 31, p. 10074-10082, 1992.

JORDAN, J.; ACKERMAN, E.; BERGER, R. L. Polarographic coefficients of oxygen defined by activity gradients in viscous media. *J. Phys. Chem.*, v. 78, p. 2979-2981, 1956.

JUFFER, H.A. et al. Comparison of atomic solvation parametric sets: Applicability and limitations in protein folding and binding. *Protein Sci.*, v. 4, p. 2499-2509, 1995.

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* v. 14, p. 1-63, 1959.

KAVANAUGH, J. S. et al. A. High-resolution X-ray study of deoxyhemoglobin Rothschild 37 β Trp $\rightarrow$ Arg: A mutation that creates an intersubunit chloride - binding site. *Biochemistry*, v. 31, n. 16, p. 4111-4121, 1992.

KILMARTIN J. V.; FOGG, J. H.; PERUTZ, M. F. Role of C-terminal histidine in the Bohr effect of human hemoglobin. *Biochemistry*, v. 19, p. 3189-3183, 1980.

KILMARTIN, J. V. et al. Role of Bohr group salt bridges in cooperativity in hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 534, p. 15-25, 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 259, n. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, B. Calculation of volume fluctuation for globular protein models. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 80, n. 2, p.622-626, 1983.

LESK, A. M. et al. Haemoglobin: The surface buried between the $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$ dimers in the deoxy and oxy structures. *J. Mol. Biol.*, v. 183, p. 297-270, 1985.

LEVY, R. M.; GALLICCHIO, E. Computer simulations with explicit solvent: Recent Progress in the thermodynamic decomposition of free energies and in modeling electrostatic effects. *Annu. Ver. Phys. Chem.*, v. 49, p. 531-567, 1998.

LIU, Y.; STUTERVANT, J. M. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. II. *Protein Sci.*, v. 4, p. 2559-2561, 1995.



LUMRY, R.; RAJENDER, S. Enthalpy-entropy compensation phenomema in water solutions of proteins and small molecules: A ubiquitous property of water. *Biopolymers*, v. 9, p. 1125-1227, 1970.

MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration. *J. Mol. Biol.*, v. 232, p. 639-659, 1993.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**: Protein function and evolution. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 1990. p.130-145.

MILLER, S. et al. Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 196, p. 641-656, 1987. apud PRIVALOV, P. L., MAKHATADZE G. I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J. Mol. Biol.*, v. 232, p. 660-679, 1993.

MILLS, F. C.; ACKERS, G. K. Thermodynamic studies on the oxygenation and subunit association of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 254, n. 8, p. 2881-2887, 1979.

MOHAN, C. Buffers: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. San Diego, Calbiochem, 1995, 28 p.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, v. 12, p. 88-118, 1965.

MURPHY, K. P. Hydration and convergence temperatures: on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys. Chem.*, v. 51, p. 311-326, 1994.

NAGHIBI, H.; TAMURA, A.; STUTERVANT, J. M. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 5597-5599, 1995.

OOI, T.; OOTBATAKE, M. Intermolecular interactions between protein and other molecules including hydration effects. *J. Biochem.*, v. 104, p. 440-444, 1988.

OOI, T. et al. Accessible surface areas as a measure of thermodynamic of hydration of peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 3086-3090, 1987.

OOTBATAKE, M.; OOI, T. Characteristic thermodynamic properties of hydrated water for 20 amino acid residues in globular proteins *J. Biochem.*, v. 104, p. 433-439, 1988.

PARSEGIAN, V. A.; RAND, R. P.; RAU, D. C. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.*, v. 259, p. 43-94, 1995.

PERUTZ, M. F. Mechanism of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q. Rev. Biophys.*, v. 22, p. 139-237, 1989.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature*, v. 228, p. 726-739, 1970.



PERUTZ, M. F. et al. A novel allosteric mechanism in haemoglobin: Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 233, p. 536-545, 1993.

PERUTZ, M. F. et al. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 27, p. 1-34, 1998.

PERUTZ, M. F. et al. Identification of residues contributing to the Bohr effect of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 138, p. 649-670, 1980.

PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T.; WILLIAMSON, D. The chloride effect in human hemoglobin: a new kind of allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, v. 239, p. 555-560, 1994.

PRIVALOV, P. L, MAKHATADZE G. I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J. Mol. Biol.*, v. 232, p. 660-679, 1993.

RAZYNSKA, A. et al. Effect of temperature on oxygen affinity and anion binding of bovine hemoglobin. *Biophys. Chem.*, v. 38, p. 111-115, 1990.

RIGGS, A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 5-29, 1981.

ROLLEMA, H. S. et al. The effect of potassium chloride on the Bohr effect of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 250, n.4 p. 1333-1339, 1975.

ROYER, W. E. Jr; et al. Ordered water molecules as key allosteric mediators in a cooperative dimeric hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 14526-14531, 1996.

SALVAY, A. G.; GRIGERA, J. R.; COLOMBO, M. F. Hydration effects on the structural properties and haem-haem interaction in hemoglobin. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 5, p. 192-197, 2003.

SALVAY, A. G.; COLOMBO, M. F. GRIGERA, J. R. The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin. *Biophys. J.*, v. 84, p. 1-7, 2002.

SEIXAS, F. A. V. **Efeito da atividade de água sobre as características estruturais e funcionais da hemoglobina humana A₀**. 1998. 73 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

SEIXAS, F.A.; AZEVEDO, F. W.; COLOMBO, M. F. Crystallization and X-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A₀ fully stripped of any anions. *Acta Cryst.*, n. D.54, p. 1-4, 1998.

SHIBAYAMA, N.; SAIGO, S. Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin. *FEBS Letters*, v. 492, p. 50-53, 2001.



SILVA, M. M.; ROGERS, P. H.; ARNONE, A. A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 24, p. 17248-17246, 1992.

STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução por João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo e Paulo Armando Motta. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Original inglês.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, v. 21, p. 6536-6544, 1982.

TINOCO JUNIOR.; I.; SAUER, K.; WANG, J. C. **Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences**. 3. ed. New Jersey: Prentice - Hall, 1995.

VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of physical biochemistry**. New Jersey. Prentice-Hall Inc., 1998.

VOET, D.; VOET, J. C. **Biochemistry**. 2.ed. Toronto: John Wiley & Sons, 1995. p. 215-250.

WILHELM, E.; BATTINE, R.; WILCOCK, R. J. Low - pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.*, v. 77, p. 219-262, 1977.

WILLIAMS, R. C.; TSAY, K. A convenient chromatographic method for the preparation of human hemoglobin. *Anal. Biochem.*, v. 54, p. 137-145, 1973.

WYMAN, J. Allosteric linkage. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 89, p. 2202-2218, 1967.

WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Protein Chem.*, v. 19, p. 223-286, 1964.

WYMAN, J.; GILL, S. J. **Binding and linkage: Functional chemistry of biological macromolecules**. Mill Valley: University Press, 1990.

7.1) Bibliografia consultada.

ACKERS, G. K.; SMITH, F. R. The hemoglobin tetramer; a three-state molecular switch for control of ligand affinity. *Annu. Rev. Biochem. Biophys.*, v. 16, p.583-609, 1987.

ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature*, v. 237, p.146-149, 1972.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Referências bibliográficas*: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

AUSTIN, R. H.; STEIN, D. L.; WANG, J. Terbium luminescence-lifetime heterogeneity and protein equilibrium conformational dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p.1541-1545, 1987.



BENESCH, R.; BENESCH, R. E. The effects of organic phosphatos from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 26, p.162-174, 1967.

BONAVENTURA, C. et al. Chloride masks effects of opposing positive charges in Hb A and Hb Hinsdale (beta139 Asn->Lys) that can modulate cooperativity as well as oxygen affinity. *J. Mol. Biol.*, v. 239, p. 561-568, 1994.

BONAVENTURA, C. et al. Conformation fluctuations in deoxy hemoglobin revealed as a major contributor to modulation of function through studies of the oxygenation and oxidation of hemoglobins A₀ and deer lodge β_2 (NAD2) His - Arg. *Biochemistry*, v. 37, p.496-506, 1998.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical Chemistry.** New York: W. H. Freeman, 1980. part III, p. 41-206.

COLOMBO, M. B. R. **Efeito de água no potencial de oxi - redução de hemoglobina humana e mioglobina eqüina.** 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

FISCHER, S.; VERMA, C. S. Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; v. 96, p. 9613-9615, 1999.

FRAUENFELDER, H.; McMAHON, B. Dynamics and function of proteins: The search for general concepts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; v. 95, p. 4795-4797, 1998.

HALLÉN, D. et al. Enthalpies and heat capacities for n-alkan-1-ols in H₂O and D₂O. *J. Chem. Thermodyn.*, v. 18, p. 429, 1986. apud MURPHY, K. P. Hydration and convergence temperatures: on the use and interpretation of correlation plots. *Biophys. Chem.*, v. 51, p. 311-326, 1994.

HOLT, J. M.; ACKERS, G. K. Pathway of allosteric control as revealed by intermediate states of hemoglobin. *FASEB J.*, v. 9, n. 2, p. 210-218, 1995.

HUANG, Y.; KOESTNER, M. L.; ACKERS, G. K. Heterotropic effects of chloride on the ligation microstates of hemoglobin at constant water activity. *Biophys. J.*, v. 71, p. 2106-2116, 1996.

IBEN, E.T. et al Glassy behavior of a protein. *Phys. Rev. Lett.* v. 232, p. 1916-1919, 1989.

JAYARAMAN, V.; SPIRO, T. G. Structure of a third cooperativity state of hemoglobin: ultraviolet resonance raman spectroscopy of cyanomethemoglobin ligation microstates. *Biochemistry*, v. 34, n. 14, p. 4511-4515, 1995.

KOSHLAND, D. E.; NÉMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, v. 5, p. 365, 1966.



LAPENNAS, N.; COLACINO, J. M.; BONVENTURA, J. Thin-Layer methods for determination of oxygen binding curves of hemoglobin solutions and blood. *Methods Enzymol.*, v. 76, p. 449-470, 1981.

LEE, A. W. et al. Analysis of proton release in oxygen binding by hemoglobin: Implications for the cooperative mechanism. *Biochemistry*, v. 27, p. 1285-1301, 1988.

MILLS, F. C.; ACKERS, G. K. Thermodynamic studies on ligand binding and subunit association of human hemoglobins: Temperature dependence of the linkage between dimer-tetramer association and oxygenation state. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 2881-2887, 1979.

MILLS, F. C. et al. Thermodynamic studies on ligand binding and subunit association of human hemoglobins: Enthalpies of binding O₂ and CO to subunit chains of hemoglobin A. *J. Biol. Chem.*, v. 254, n. 8, p. 2875-2880, 1979.

MINTON, A. P.; IMAI, K. The tree-state model: A minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 71, n. 4, p. 1418-1421, 1974.

PETUKHOV, M. et al. Local water bridges and protein conformational stability. *Protein Sci.*, v. 8, p. 1982-1989, 1999.

POYART, C.; BURSAUX, E.; BOHN, B. Determination directe de la première constante d'association (A₁) de l'O₂ à l'hémoglobine humaine. Influence des effecteurs heterotropes. *INSERM Colloq.*, v. 70, p. 51-56, 1977.

SHIH, D. T. et al. A mutagenic study of the allosteric linkage of His(HC3) 146 β in haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 230, p. 1291-1296, 1993.

SHIH, D. T.; PERUTZ, M. F. Influence of anions and protons on the Adair coefficients of haemoglobins A and cowtown (HisHC3 (146) β ----Leu). *J. Mol. Biol.*, v. 195, p. 419-422, 1987.

SUN, D. P. et al. Contribution of surface histidyl residues in the α -chain to the Bohr effect of human normal adult hemoglobin: Roles of global electrostatic effects. *Biochemistry*, v. 36, p. 6663-6673, 1997.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1995. 4v., v. 4: Dissertações e Teses.

VORGER, P. Thermodynamic studies on oxygen binding by human red blood cells. *CBP-Comp. Biochem. Physiol.*, v. 123, Part A, p. 329-336, 1999.

WOLFENDEM, R. et al. Affinities of amino acid side-chains for solvent water. *Biochemistry*, v. 20, p. 849-855, 1981. apud OOI, T. et al. Accessible surface areas as a measure of thermodynamic of hydration of peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 3086-3090, 1987.



7.2) Participações em congressos.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes congressos:

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. *Determination of the binding parameters of O₂ to hemoglobin using a modified spectropolarimetric cell.* In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 27., 1998, Caxambú. *Anais...* Caxambú: SBBq, 1998. p.M. 60.

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. *The effects of temperature and water activity on hemoglobin oxygenation.* In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 28., 1999, Caxambú. *Anais...* Caxambú: SBBq, 1999. p.M. 99.

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. *Effect of solvation on the enthalpy, entropy and free energy of human hb oxygenation.* In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 29., 2000, Caxambú. *Anais...* Caxambú: SBBq, 2000. p.M. 28.

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. *Effect of solvation on the enthalpy, entropy and free energy of human hb oxygenation.* In: CONGRESSO BIOFÍSICA DO CONE-SUL, 4., 2000, Campinas. *Anais...* Campinas: Cone-Sul, 2000. p.F. 22.

SEIXAS, F. A. V.; CAÔN F., O.; CASTRO, O. A.; COLOMBO, M. F. *Anion effects on hemoglobin Structure and functions: A view from the hidration changes upon O₂ Binding.* In: INTERNATIONAL CONFERENCE OXYGEN BINDING AND/ACTIVATING SENSING HEME PROTEINS, 1998, Monterey.

COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V.; CAÔN FILHO, O. *Anion Effects on hemoglobin Structure and functions: A View from the Hydration Charges Upon O₂ Binding* In: INTERNATIONAL BIOPHYSICS CONGRESS, 8., New Delhi. *Anais...* New Delhi, 1999.

COLOMBO, M. F.; CAÔN FILHO, O. *The Enthalpy and Entropy values of protein solvation in aqueous solution: A Realistic Approach.* In: SYMPOSIUM THE PROTEIN SOCIETY, 8., Philadelphia. *Anais...* Philadelphia: Protein Sci, 2001. p. 427.

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. *The Enthalpy and Entropy cost of protein hydration in aqueous solution: A Realistic Approach.* In: SATELLITE MEETING OF THE XIV INTERNATIONAL BIOPHYSICS CONGRESS, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2002.



Anexo A – Efeito da temperatura no ΔC_p de oxigenação da Hb.

Como mencionado nas páginas 88 e 89, nossos resultados sugerem que o ΔH de oxigenação independe da temperatura. Esse comportamento indica que a variação da capacidade térmica (ΔC_p) associada à reação de oxigenação não é influenciada pela temperatura. Essa possibilidade foi investigada determinando-se valores de ΔC_p de oxigenação a partir da equação integrada de van't Hoff que foi aplicada aos dados experimentais (Nagoshi et al., 1983; Liu & Sturtevant, 1993; Lago et al., 1997; Doyle & Hensley, 1999).

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H_o - T_o \Delta C_p}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T_2}{T_1} \quad (58)$$

ANEXOS

Para tanto, a rotina ΔC_p dos quadros não lineares (Microcal Origin), foi implementada no software ORIGIN. Nesta rotina, T_o é a temperatura de referência (298 K) e ΔH_o e K_o são os valores de entalpia e de van't Hoff ($\ln K$) na temperatura.

A tabela 11 apresenta os valores de ΔH de oxigenação obtidos a partir do gráfico de van't Hoff ($\Delta H_{\text{oxigenação}}$) e os valores de ΔH calculados a partir da equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculado}}$). Nota-se que, dentro da erro experimental, os valores de ΔH são os mesmos. Enquanto que os valores de ΔC_p são pequenos e dependendo da condição experimental são maiores que o próprio erro, o que nos leva a concluir que estes valores de capacidade calorífica de oxigenação da Hb não sofrem influência da temperatura, pelo menos na faixa de temperatura em que as curvas de oxigenação foram obtidas.

Anexo A - Efeito da temperatura no ΔC_p de oxigenação da Hb.

Como mencionado nas páginas 88 e 89, nossos resultados sugerem que o ΔH de oxigenação independe da temperatura. Este comportamento indica que a variação da capacidade térmica (ΔC_p) associada à reação de oxigenação não é influenciada pela temperatura. Esta possibilidade foi investigada, determinando dos valores de ΔC_p de oxigenação a partir da equação integrada de van't Hoff que foi aplicada aos dados experimentais (Naghibi et al., 1995; Liu & Sturtevant, 1995; Fago et al., 1997, Doyle & Hensley, 1998).

$$\ln \frac{K_i}{K_i^0} = \frac{\Delta H_0 - T_0 \Delta C_p}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T}{T_0} \quad (59)$$

Para tanto, a rotina de ajuste dos mínimos quadrados não lineares (Marquardt-Levenberg), foi implementada no software ORIGIN. Nesta equação, T_0 é a temperatura de referencia (298 K) e ΔH_0 e K_i^0 são os valores da entalpia de van't Hoff de P_{50} (e K_1) nesta temperatura.

A tabela 15 apresenta os valores do ΔH de oxigenação obtidos a partir do gráfico de van't Hoff ($\Delta H_{\text{van't hoff}}$) e os valores de ΔH calculados a partir do ajuste da equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculados}}$). Nota-se que, dentro do erro experimental, os valores de ΔH , são os mesmos. Enquanto que, os valores de ΔC_p são pequenos e dependendo da condição experimental são menores que o próprio erro, o que nos leva a concluir que estes valores de capacidade calorífica de oxigenação da Hb não sofrem influencia da temperatura, pelo menos não no intervalo de temperatura em que as curvas de oxigenação foram obtidas.

pH = 7,3					
[NaCl] (mM)	$\Delta n_w(P_{50})$ (H ₂ O/Hb)	ΔG (kcal/mol.heme)	$\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ (kcal/mol.heme)	ΔH_0 integrada (kcal/mol.heme) ΔC_p (kcal/mol.K)	ΔS (cal/mol.K)
200	71 ± 4	1,29 ± 0,017	-11,23 ± 0,19	-11,15 ± 0,09 -0,21 ± 0,03	-42,0 ± 0,70
100	72 ± 3	1,09 ± 0,024	-10,65 ± 0,41	-10,47 ± 0,7 -0,17 ± 0,24	-39,4 ± 1,45
25	63 ± 1	0,95 ± 0,017	-9,54 ± 0,34	-9,33 ± 0,13 -0,04 ± 0,04	-35,2 ± 1,20
15	49 ± 2	0,81 ± 0,022	-7,78 ± 0,75	-7,55 ± 0,2 -0,006 ± 0,06	-28,8 ± 2,60
10	47 ± 3	0,77 ± 0,018	-7,05 ± 0,26	-6,91 ± 0,11 -0,10 ± 0,03	-26,3 ± 0,93
5	35 ± 1	0,55 ± 0,05	-4,42 ± 0,13	-4,34 ± 0,11 -0,078 ± 0,04	-16,7 ± 0,61
3,5	25 ± 1	0,48 ± 0,012	-3,67 ± 0,1	-3,59 ± 0,18 -0,002 ± 0,06	-14,0 ± 0,40
0	24 ± 1	0,33 ± 0,015	-3,62 ± 0,24	-3,59 ± 0,07 0,06 ± 0,02	- 13,3 ± 0,85
pH = 9,0					
100	71 ± 1	0,27 ± 0,02	-11,27 ± 0,26	-11,23 ± 0,13 -0,073 ± 0,04	-38,72 ± 1
15	48 ± 2	0,18 ± 0,006	-7,80 ± 0,80	-7,57 ± 0,33 -0,010 ± 0,016	-26,79 ± 2,7
0	25 ± 1	0,09 ± 0,02	- 3,62 ± 0,16	-3,49 ± 0,14 -0,032 ± 6x10 ⁻⁴	-12,47 ± 0,26

Tabela 15 : Comparação entre o ΔH de oxigenação total obtido pela inclinação do gráfico de $\ln P_{50} \times 1/T$ ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$) e o calculado pela equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculado}}$). Os experimentos foram obtidos em soluções contendo diferentes concentrações de NaCl, em 10 mM Hepes em pH 7,3 e 10 mM Ches em pH 9.0

A figura 46 mostra o gráfico de $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ e $\Delta H_{\text{calculado}}$ contra $\log [\text{NaCl}]$, que foram montados com os resultados apresentados na tabela acima. As curvas foram analisadas segundo o modelo proposto por Seixas e Colombo (1999) e os resultados obtidos para o ΔH de oxigenação através do gráfico de van't Hoff foram: $\Delta H_{P_{50}}^{\text{inicial}} = -3,37 \pm 0,36$ kcal/mol.heme;

$\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,98 \pm 0,30 \text{ kcal/mol.heme}$; $K_X = 12 \pm 1 \text{ mM}$; e $n = 2 \pm 0,36$ enquanto que para os dados gerados a partir da equação integrada de van't Hoff, temos: $\Delta H_{P50}^{\text{inicial}} = -3,32 \pm 0,37 \text{ Kcal/mol.heme}$; $\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,71 \pm 0,31 \text{ Kcal/mol.heme}$; $K_X = 12 \pm 1 \text{ mM}$; e $n = 2,1 \pm 0,36$.

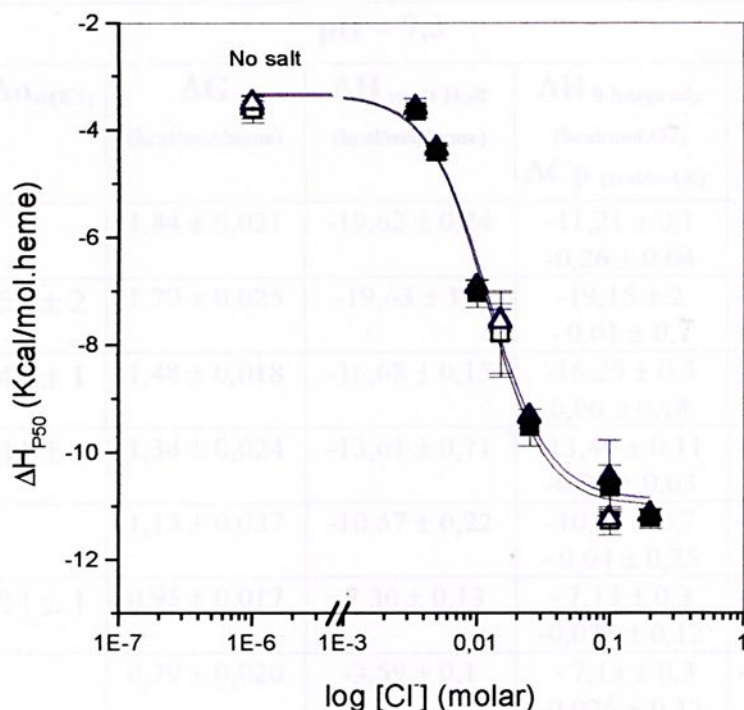


Figura 46: Comparação da mudança da variação de entalpia de oxigenação da Hb humana em tampão Hepes 10 mM, pH 7,3, contra a concentração molar de NaCl. Os quadrados pretos representam os valores de ΔH foram obtidos a partir da inclinação do gráfico de $\ln P_{50} \times 1/T$ ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$), enquanto que os triângulos azuis correspondem aos valores de entalpia de oxigenação calculados utilizando a equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculado}}$). As linhas contínuas representam o melhor ajuste logístico sigmoideal com os seguintes parâmetros para $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$: $\Delta H_{P50}^{\text{inicial}} = -3,37 \pm 0,36 \text{ kcal mol.heme}$; $\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,98 \pm 0,30 \text{ kcal/mol.heme}$; $K_X = 12 \pm 1 \text{ mM}$; e $n = 1,98 \pm 0,36$ e para $\Delta H_{\text{calculado}}$: $\Delta H_{P50}^{\text{inicial}} = -3,32 \pm 0,37 \text{ kcal/mol.heme}$; $\Delta H_{P50}^{\text{final}} = -10,71 \pm 0,31 \text{ kcal/mol.heme}$; $K_X = 12 \pm 1 \text{ mM}$; e $n = 2,1 \pm 0,36$.

Os valores apresentados na tabela 15 e os resultados apresentados pelo ajuste da fig. 46 reforçam a proposição de que o ΔH de oxigenação da

Hb humana é insensível a temperatura, comprovando que a variação da capacidade calórica associada à reação de oxigenação da Hb independe da temperatura. Este raciocínio e conclusão também são utilizados para analisar os dados de ΔH de ligação da 1ª molécula de O_2 à Hb humana, como mostra a tabela 16 e a figura 47.

pH = 7,3					
[NaCl] (mM)	$\Delta n_{w(K1)}$	ΔG (kcal/mol.heme)	$\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ (kcal/mol.heme)	ΔH_{θ} integrada (kcal/mol.O2) ΔC_p (kcal/mol.K)	ΔS (cal/mol.K)
200		$1,84 \pm 0,021$	$-19,62 \pm 0,24$	$-11,21 \pm 0,1$ $-0,26 \pm 0,04$	$-72,00 \pm 0,87$
100	52 ± 2	$1,79 \pm 0,025$	$-19,63 \pm 1,0$	$-19,15 \pm 2$ $-0,01 \pm 0,7$	$-71,56 \pm 3,44$
25	48 ± 1	$1,48 \pm 0,018$	$-16,68 \pm 0,15$	$-16,25 \pm 0,5$ $0,06 \pm 0,18$	$-60,95 \pm 0,11$
15	44 ± 1	$1,34 \pm 0,024$	$-13,61 \pm 0,71$	$-13,40 \pm 0,11$ $-0,04 \pm 0,03$	$-50,16 \pm 2,46$
10		$1,13 \pm 0,037$	$-10,57 \pm 0,22$	$-10,25 \pm 0,7$ $-0,04 \pm 0,25$	$-39,05 \pm 0,86$
5	34 ± 1	$0,95 \pm 0,017$	$-7,30 \pm 0,13$	$-7,13 \pm 0,3$ $-0,026 \pm 0,12$	$-27,67 \pm 0,49$
3,5		$0,79 \pm 0,020$	$-3,59 \pm 0,1$	$-7,13 \pm 0,3$ $-0,026 \pm 0,12$	$-14,70 \pm 0,40$
0	26 ± 2	$0,72 \pm 0,022$	$-3,66 \pm 0,14$	$-3,58 \pm 0,14$ $-0,014 \pm 0,04$	$-14,70 \pm 0,54$
pH = 9,0					
100	51 ± 1	$0,44 \pm 0,04$	$-19,12 \pm 0,15$	$-18,02 \pm 1,10$ $-0,058 \pm 0,034$	$-65,66 \pm 0,65$
15	$45 \pm 0,5$	$0,34 \pm 0,02$	$-13,28 \pm 0,31$	$-12,91 \pm 0,50$ $-0,34 \pm 0,14$	$-41,60 \pm 0,20$
0	26 ± 1	$0,24 \pm 0,02$	$-3,64 \pm 0,11$	$-3,27 \pm 0,30$ $-0,087 \pm 0,086$	$-13,00 \pm 0,31$

Tabela 16: Comparação entre o ΔH de oxigenação para K_1 obtido pela inclinação do gráfico de $\ln K_1 \times 1/T$ ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$) e o calculado pela equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculado}}$). Os experimentos foram obtidos em soluções contendo diferentes concentrações de NaCl, em 10 mM Hepes em pH 7,3 e 10 mM Ches em pH 9.0.

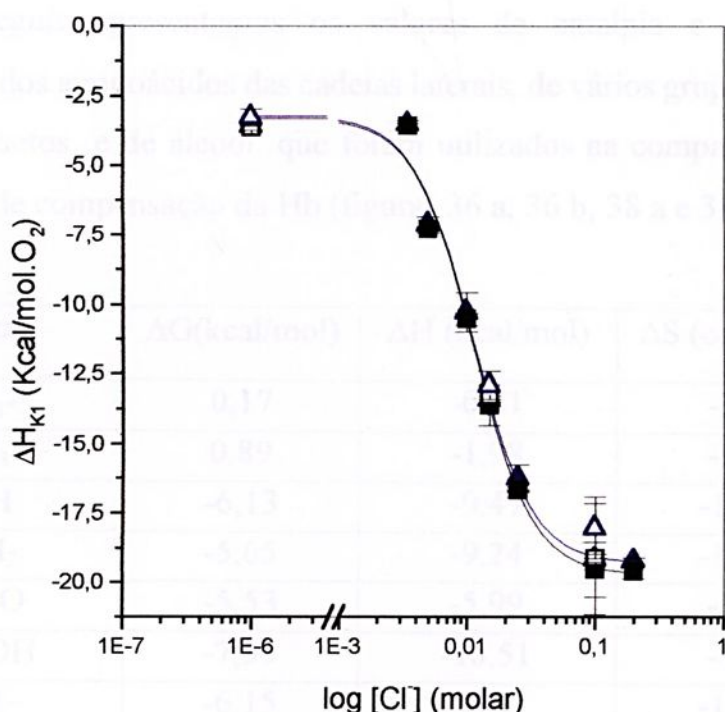


Figura 47: Comparação da mudança da variação de entalpia de oxigenação da Hb humana em tampão Hepes 10 mM, pH 7,3, contra a concentração molar de NaCl. Os quadrados pretos representam os valores de ΔH foram obtidos a partir da inclinação do gráfico de $\ln P_{50} \times 1/T$ ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$), enquanto que os triângulos azuis correspondem aos valores de entalpia de oxigenação calculados utilizando a equação integrada de van't Hoff ($\Delta H_{\text{calculado}}$). As linhas contínuas representam o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros para $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$: $\Delta H_{K1}^{\text{inicial}} = -3,30 \pm 0,82$ kcal/mol.O₂; $\Delta H_{K1}^{\text{final}} = -19,71 \pm 0,30$ kcal/mol.O₂; $K_X = 11 \pm 1$ mM; e $n = 1,89 \pm 0,34$ e para $\Delta H_{\text{calculado}}$: $\Delta H_{K1}^{\text{inicial}} = -3,22 \pm 0,8$ kcal/mol.heme; $\Delta H_{K1}^{\text{final}} = -19,30 \pm 0,67$ kcal/mol.heme; $K_X = 11 \pm 1$ mM; e $n = 1,89 \pm 0,34$.

Assim como para P_{50} os resultados apresentados pelo ajuste da fig. 47 reforçam a proposição de que o ΔH obtido para K_1 é insensível a temperatura, indicando que a variação da capacidade calórica associada à reação de ligação do primeiro O₂ à Hb independe da temperatura.

Anexo B – Tabelas com valores de entalpia e entropia de hidratação.

A seguir apresentamos os valores da entalpia e entropia de solvatação dos aminoácidos das cadeias laterais, de vários grupos químicos, hidrocarbonetos e de álcool, que foram utilizados na comparação com o fenômeno de compensação da Hb (figuras 36 a, 36 b, 38 a e 38 b)

Grupo	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol.K})$
-CH ₂ -*	0,17	-0,81	-3,30
-CH ₃ *	0,89	-1,98	-9,63
-OH	-6,13	-9,47	-11,22
-NH ₂	-5,65	-9,24	-12,02
>C=O	-5,53	-5,99	-1,54
-COOH	-7,59	-10,51	-9,82
-NH-	-6,15	-9,27	-10,43
-CH<*	-0,39	-0,68	-3,57
>C<*	-1,16	-2,02	-10,68
-S-	-3,45	-4,68	-4,13
-CH=*	-0,14	-0,63	-2,59
-C=	-1,09	-4,86	-12,63

Tabela 17: ΔH , ΔG e ΔS de hidratação de diferentes grupos, estimados a partir da área de superfície acessível ao solvente (Makhatadze & Privalov, 1993). As variações de energia livre de hidratação foram calculados a partir de dados experimentais de transferência de grupos determinados por Cabani e colaboradores (Cabani et al., 1981) e citadas por Makhatadze e Privalov, 1993. Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$ Os grupos marcados (*) referem-se aqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação da hemoglobina humana (figuras 36 a, 36 b, 38 a e 38 b).

Resíduo	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol, K})$
Ala*	0,38	-1,16	-5,17
Asp	-2,42	-3,88	-4,90
Cys	-1,07	-2,68	-5,40
Glu	-3,13	-4,94	-6,07
Phe	-0,58	-4,42	-12,88
Gly	0,00	0,00	0,00
His	-2,80	-6,10	-11,07
Ile*	0,99	-3,04	-13,52
Lys	-1,63	-4,35	-9,13
Leu*	0,88	-2,72	-12,08
Met	0,02	-3,36	-11,34
Asn	-3,11	-5,13	-6,78
Pro*	0,05	-1,55	-5,37
Gln	-3,34	-5,52	-7,31
Arg	-5,39	-9,72	-14,53
Ser	-3,06	-5,07	-6,74
Thr	-1,39	-3,69	-7,72
Val*	0,78	-2,39	-10,64
Trp	-3,22	-8,21	-16,74
Tyr	-5,19	-10,01	-9,73

Tabela 18: Parâmetros de solvatação de resíduos de aminoácidos apresentados por Oobatake e colaboradores (Oobatake et al, 1988). Estes parâmetros foram calculados a partir da ASA de 7 grupos atômicos. Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, por obedecendo a expressão $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. (*) representa os resíduos hidrofóbicos que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação da hemoglobina humana (figuras 36 a, 36 b, 38 a e 38 b).

Alcano	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol.K})$
Metano	2,00	-3,15	-17,3
Etano	1,83	-4,67	-21,8
Propano	1,96	-5,56	-25,2
Butano	2,08	-6,20	-27,8

Tabela 19: Energética de dissolução de alcanos (substâncias não-polares) da fase gasosa para a água em 25 °C. Os dados experimentais de ΔH foram obtidos calorimetricamente por Dec e Gill (Dec & Gill, 1985) enquanto que ΔG foram tabelados por Cabani e colaboradores (Cabani et al., 1981) usando o estado padrão molar da fase gás e solução, conforme citação de Murphy (Murphy, 1994). Os valores de ΔS foram calculados por obedecendo a expressão $\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / 298$. Estes resultados mostram o alinhamento de grupos não-polares (radical metileno) com o fenômeno de compensação de oxigenação da hemoglobina humana (figuras 36 a, 36 b, 38 a e 38 b).

Hidrocarboneto	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol.K})$
Benzeno	0,541	0,50	-0,14
Tolueno	0,461	0,41	-0,17
Etilbenzeno	0,537	0,48	-0,19
Ciclohexano	0,048	-0,02	-0,23
Pentano	-0,409	-0,48	-0,24
Hexano	0,077	0	-0,26

Tabela 20: Parâmetros termodinâmicos de transferência de substâncias não-polares (hidrocarbonos) líquidas para a água em 25 °C. Os valores experimentais de ΔH foram obtidos por Gill e colaboradores (Gill et al., 1976), enquanto que ΔH e ΔG foram calculados por Baldwin (Baldwin, 1986) e mostram-se alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação da hemoglobina humana (figuras 36 a, 36 b, 38 a e 38 b).

Resíduo	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol.K})$
Ala*	0.89	-1.98	-9.62
Arg	-10.99	-16.01	-16.85
Asn	-7.39	-11.30	-13.12
Asp	-2.06	-5.48	-11.46
Cys	-10.81	-16.82	-20.17
Gln	-7.21	-12.11	-16.44
Glu	-11.36	-16.63	-17.67
His	1.57	-4.09	-18.98
Ile*	1.57	-4.09	-18.98
Leu*	-5.11	-11.65	-21.95
Lys	-2.19	-8.27	-20.38
Met	-1.63	-6.05	-14.81
Phe*	0.54	-2.43	-9.95
Pro	-5.94	-10.27	-14.52
Ser	-5.62	-10.76	-17.26
Thr	-9.97	-14.04	-13.67
Trp*	-8.70	-13.70	-16.78
Tyr	1.39	-3.27	-15.67
Val	-11.67	-14.22	-8.58

Tabela 21: ΔG e ΔH de hidratação obtidos a partir da transferência da fase gasosa para a água, de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína (Privalov & Makhatadze., 1993). Os valores da variação de entalpia foram calculados com base em valores de área acessível ao solvente – ASA publicados por Miller e colaboradores (Miller et al., 1987). Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / 298$. Os grupos marcados (*) estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação da Hb humana (figuras 36 a, 36 b; 38 a e 38 b).

Proteína	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H (\text{kcal/mol})$	$\Delta S (\text{cal/mol.K})$
4PTI	-1,00	-2,27	-4,29
1CPV	-2,11	-4,79	-9,00
5RSA	-2,94	-6,16	-10,81
2LYZ	-2,84	-6,36	-11,80
2MBN	-2,99	-7,38	-14,86
2LZM	-3,62	-8,43	-16,14
8PAP	-4,56	-10,80	-20,95
2CAB	-5,96	-13,71	-26,03

Tabela 22: Parâmetros termodinâmicos de hidratação associados determinados tendo como base interações interatômicas que ocorrem com o desnovelamento protéico. Estes parâmetros foram calculados a partir da ASA de todos os grupos atômicos das 8 proteínas citadas acima por Ooi e colaboradores (Ooi et al, 1988).

Glossário

High sens = alta sensibilidade, elevada percepção

G-ring = anel, círculo, argola, qualquer coisa em forma anular, roda, anel da valvulação

Stradan = paixão, que surge como paixão, modo

Glossário*

* Baseado em:

BRASIL. D. O. Dicionário português português - português inglês. São Paulo: Companhia
Editorial, 1997. 261 p.

High sen's = alta sensibilidade, elevada percepção.

O-ring = anel, círculo, argola, qualquer coisa em forma anular, roda; anel de vedação.

Standart = padrão, que serve como padrão, modelo.

* Baseado em :

MICHAELIS, H. Dicionário prático inglês português - português inglês. São Paulo: Companhia Melhoramentos de São Paulo, 1987. 861p.



