

ESTUDO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DA OXIHEMOGLOBINA

J.K. Andreazza, C.F. Almeida e L. T. Pinto

*Departamento de Eng. Química e de Eng. de Alimentos/UFSC, Florianópolis, Brasil

j_andreazza@hotmail.com

Abstract: In surgery, accidents or severe anemia, can be interrupted the flow of oxygen to brain tissue, causing ischemia or cellular hypoxia. Human blood substitutes have been studied for decades without success. One of the goals is to make blood banks not the only option for surgeries e for those who need transfusion. The artificial blood is known as oxygen therapeutics and hemoglobin-based oxygen carriers. The last one is because oxygen is transported in the blood by association with hemoglobin molecules (Hb₄). That makes the chemical reaction between Hb₄ and oxygen very important. The determination of kinetic coefficients of this reaction is difficult because it is very fast. For this reason there are few experiments available in literature, leading researchers to adopt simplifications that work only in specific situations. Therefore, in this paper, is proposed a dynamic mathematical model for the four steps reaction involving Hb₄-O₂. The resulting set of ordinary differential equations (ODE) is solved by Euler's method. The kinetic parameters are obtained by the technique of genetic algorithm from experimental data in literature. The concentration profiles of each compound are presented and the results are compared with the curve of hemoglobin saturation in normal conditions.

Palavras-chave: Cinética, otimização, hemoglobina e oxigênio.

Introdução

Uma das dificuldades no desenvolvimento de um fluido que possa servir de alternativa ao sangue humano é o fato que este realiza diferentes funções, tais como, o transporte de gases respiratórios pela molécula de hemoglobina (Hb₄) presente nas hemácias, a defesa do organismo realizada pelos glóbulos brancos e a coagulação sanguínea é responsabilidade das plaquetas. Os primeiros substitutos surgiram durante a segunda guerra mundial, mas não eram capazes de transportar oxigênio, somente manter o volume sanguíneo. Já na guerra do Vietnã, utilizaram-se soluções aquosas de hemoglobina, entretanto esta solução comprometia o funcionamento renal. Verificou-se que a hemoglobina quando retirada das hemácias perde sua capacidade de transporte e ainda se torna tóxica as células renais. Sabe-se que 98% do oxigênio transportado pelo sangue está associado às moléculas de hemoglobinas. Além

disso, outra característica importante da Hb₄, é sua capacidade de se ligar reversivelmente ao oxigênio no pulmão e liberá-lo nos capilares sanguíneos dos tecidos. Mudanças no metabolismo celular, pH e temperatura, afetam diretamente a ligação da hemoglobina com oxigênio [1]. O desafio dos cientistas é produzir uma molécula com as mesmas características da hemoglobina humana e que não seja tóxica [2]. Para isto é fundamental entender como ocorre o processo de ligação entre Hb₄-O₂ para que o fornecimento de oxigênio seja suficiente para a manutenção da homeostase.

Testes experimentais foram realizados para compreensão da reação Hb₄-O₂. Um dos itens analisados nestes experimentos é a determinação da velocidade com que o oxigênio se associa e dissocia da molécula de Hb₄. O primeiro trabalho foi realizado em 1910 por Hill [3] que descreveu a reação Hb₄-O₂ desconsiderando os sítios reativos disponíveis para o oxigênio se ligar a hemoglobina. Anos mais tarde, Adair [4] considerou que quatro moléculas de oxigênio se ligam cooperativamente com uma molécula de Hb₄ em quatro sítios de ligação diferentes, formando uma série de compostos intermediários [5]. Gibson [6] determinou experimentalmente, utilizando hemoglobinas humanas, as quatro constantes de associação e as quatro constantes de dissociação envolvidas nas quatro etapas das reações consecutivas e reversíveis da hemoglobina com O₂ o que é fundamental para o estudo dos fenômenos associados ao fornecimento de O₂ para as células teciduais a partir dos capilares sanguíneos.

No entanto, os valores de Gibson não atendem as condições de saturação de Hb₄ no sangue, deixando novamente uma lacuna neste assunto. Com o objetivo de fechar esta lacuna, neste trabalho é proposto um modelo matemático da reação entre a hemoglobina e o oxigênio. Os parâmetros cinéticos são determinados por uma técnica de otimização baseada em algoritmo genético, a partir de dados experimentais obtidos por Gibson [6]. Agora com os valores corretos destas constantes cinéticas, pode-se obter os perfis das concentrações de todos os intermediários da reação Hb₄-O₂ e verificar se a necessidade de O₂ nos capilares sanguíneos é atendida, para que não haja nenhum foco de anoxia ou isquemia no tecido celular.

Materiais e Métodos

A molécula de hemoglobina possui um arranjo simétrico com quatro unidades não peptídicas, o grupo heme, contendo um anel de protoporfirina e um íon ferroso (Fe^{2+}), Figura 1. Em 1935 foi descoberto que o oxigênio se liga a Hb_4 no grupo heme [7]. Esta ligação apresenta um comportamento cooperativo, o qual é explicado pelo fato que a ligação de um grupo heme aumenta a afinidade dos outros grupos. Cada molécula de Hb_4 pode transportar quatro moléculas de oxigênio. Outra característica desta reação é que ela é facilmente reversível. A molécula de Hb_4 associada ao O_2 é chamada de oxihemoglobina.

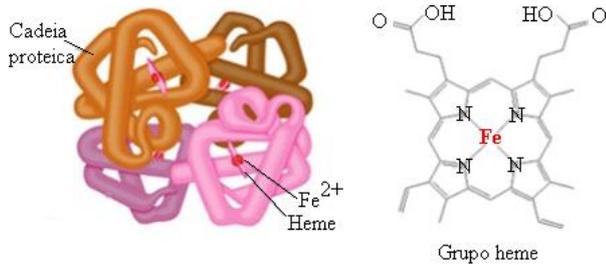
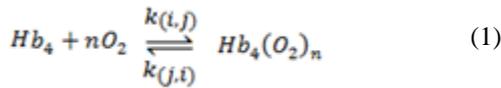
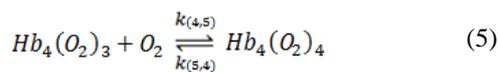
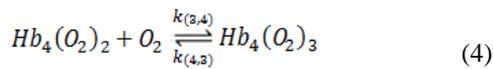
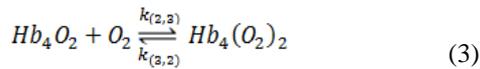
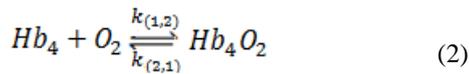


Figura 1– Estrutura simplificada da hemoglobina e fórmula estrutural do grupo heme [8].

Modelo Matemático – A equação (1) descreve a estequiometria global da reação Hb_4-O_2 ,



As quatro moléculas de heme reagem sequencialmente e reversivelmente com quatro moléculas de O_2 de acordo com as equações estequiométricas (2) – (5).



Considerando as quatro etapas, ficaremos com um conjunto de equações diferenciais ordinárias descritas nas equações (6) – (11), estas fornecem o perfil dinâmico das concentrações de hemoglobina e oxigênio livres, e de oxihemoglobina com uma, duas, três e quatro moléculas de oxigênio, e de oxigênio.

Os termos diferenciais representam as taxas das reações entre a hemoglobina e o oxigênio e do consumo do oxigênio, que ocorrem no interior dos eritrócitos. Nas equações ‘C’ são as concentrações (mol do

composto/cm³) e ‘t’ tempo (s). Os subscritos $Hb_4(O_2)_i$ e O_2 , referem-se, respectivamente, a hemoglobina livre, hemoglobina ligada a uma, duas, três ou quatro moléculas de oxigênio e o oxigênio livre.

$$\frac{dC_{Hb_4}}{dt} = k_{(2,1)} \cdot C_{Hb_4O_2} - k_{(1,2)} \cdot (C_{Hb_4} \cdot C_{O_2}) \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{Hb_4O_2}}{dt} &= k_{(1,2)} \cdot (C_{Hb_4} \cdot C_{O_2}) \\ &- k_{(2,1)} \cdot C_{Hb_4O_2} \\ &- k_{(2,3)} \cdot (C_{Hb_4O_2} \cdot C_{O_2}) \\ &+ k_{(3,2)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_2} \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{Hb_4(O_2)_2}}{dt} &= k_{(2,3)} \cdot (C_{Hb_4O_2} \cdot C_{O_2}) \\ &- k_{(3,2)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_2} \\ &- k_{(3,4)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_2} \cdot C_{O_2}) \\ &+ k_{(4,3)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_3} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{Hb_4(O_2)_3}}{dt} &= k_{(3,4)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_2} \cdot C_{O_2}) \\ &- k_{(4,3)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_3} \\ &- k_{(4,5)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_3} \cdot C_{O_2}) \\ &+ k_{(5,4)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_4} \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{Hb_4(O_2)_4}}{dt} &= k_{(4,5)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_3} \cdot C_{O_2}) \\ &- k_{(5,4)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_4} \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{O_2}}{dt} &= k_{(2,1)} \cdot C_{Hb_4O_2} \\ &- k_{(1,2)} \cdot C_{Hb_4} \cdot C_{O_2} \\ &+ k_{(3,2)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_2} \\ &- k_{(2,3)} \cdot (C_{Hb_4O_2} \cdot C_{O_2}) \\ &+ k_{(4,3)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_3} \\ &- k_{(3,4)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_2} \cdot C_{O_2}) \\ &+ k_{(4,5)} \cdot C_{Hb_4(O_2)_4} \\ &- k_{(5,4)} \cdot (C_{Hb_4(O_2)_3} \cdot C_{O_2}) \end{aligned} \quad (11)$$

Conforme descrito nas equações acima, as constantes de associação são dadas como $k_{(1,2)}$, $k_{(2,3)}$, $k_{(3,4)}$ e $k_{(4,5)}$ e as dissociação como $k_{(2,1)}$, $k_{(3,2)}$, $k_{(4,3)}$ e $k_{(5,4)}$. O conjunto de equações diferenciais ordinárias obtidas na modelagem matemática é solucionado pelo método numérico de Euler de primeira ordem.

As condições iniciais são: $C_{O_2} = C_{O_2}^{ini}$, $C_{Hb_4} = C_{Hb_4}^{ini}$, $C_{Hb_4O_2}$, $C_{Hb_4(O_2)_3}$ e $C_{Hb_4(O_2)_4}$ são nulas.

Algoritmo Genético – Uma técnica de otimização muito utilizada nas engenharias é a de algoritmo genético. Esta tem como inspiração o princípio Darwiniano de seleção natural e de reprodução genética e está baseada em uma população inicial que utiliza

operadores de seleção e re-combinação para gerar novos pontos amostrais em um espaço de busca. Quando não há cruzamento nem mutação, os “filhos” são idênticos aos “pais”. A cada nova geração têm-se uma nova população de solução potencial, a qual será avaliada. Os membros da população se reproduzem e os “filhos” são analisados. Em um extremo tem-se a sobrevivência apenas do mais forte, onde apenas o mais apto será reproduzido na próxima geração, no qual tem-se uma valorização extrema de uma região local, às custas de uma rápida perda de diversidade genética da população. O algoritmo genético necessita de alguns parâmetros para obtenção de melhor solução, sendo estes a probabilidade de cruzamento, a probabilidade de mutação e o tamanho da população.

A para obter-se os coeficientes cinéticos de associação e dissociação das reações cinéticas envolvendo Hb_4 e O_2 , a técnica de otimização seguiu os 7 passos a seguir:

- 1) Informado os valores da saturação da hemoglobina com o tempo obtida experimentalmente;
- 2) É criada a população inicial das constantes cinéticas composta por $N_k = 50$ conjuntos. Cada conjunto é representado por um vetor contendo as 8 constantes cinéticas desejadas, as 4 primeiras posições representam as constante de associação e as próximas de dissociação. Os valores destas constantes cinéticas são escolhidas aleatoriamente dentro espaço de busca de 0,01 à 2.000;
- 3) No loop do número de iterações computacionais, n , verifica-se $n =$ critério de parada, neste trabalho $n = 20.000$, se sim, tem-se os valores das constantes e termina o programa, se não, continua;
- 4) Resolve-se as equações cinéticas, (6)–(11), para todas as etapas da reação para cada um dos conjuntos gerados;
- 5) Com as concentrações obtidas no passo 4, calcula-se a saturação estimada, sat_{est} , com a equação (12). Com este valor e a saturação experimental, sat_{exp} , é calculado o erro utilizando mínimos quadrados, equação (13).

$$sat_{est}(\%) = \frac{100}{C_{Hb_4}^{ini}} \cdot \left(\frac{C_{Hb_4 O_2}}{4} + \frac{C_{Hb_4(O_2)2}}{3} + \frac{3}{4} C_{Hb_4(O_2)3} + C_{Hb_4(O_2)4} \right) \quad (12)$$

$$erro(p) = erro(p) + (sat_{est} - sat_{exp})^2 \quad (13)$$

Onde $erro(p)$ é o erro acumulado das “p” populações.

6) Selecionado os melhores 10 conjuntos, ou seja, os conjuntos de constantes que geram os menores erros. Estes são preservados para a próxima iteração computacional;

7) Inicia a etapa de geração dos filhos a partir dos selecionados no passo 6, ou seja, serão criados 40 filhos, sendo 10 por acasalamento, 10 por mutação 1, 10 por mutação 2 e 10 novos obtidos randomicamente dentro do mesmo espaço de busca de 0,01 e 2.000;

7.1) O acasalamento consiste na geração de filhos através do cruzamento entre os “genes” dos pais. Os

pais serão os 10 melhores conjuntos. Aqui denominar-se-á mães do primeiro ao quinto melhor conjunto e os pais do sexto ao décimo. São chamados de genes de associação e genes de dissociação, respectivamente, os valores das constantes de associação e dissociação. Estes pais formam 10 filhos, ou seja, os próximos 10 conjuntos. Do primeiro ao quinto filho serão formados com os genes de associação da mãe e os genes de dissociação do pai. Já do sexto ao décimo filho, inverte, a mãe doa os genes de dissociação e o pai os de associação;

7.2) A formação dos filhos por meio da mutação 1 e da 2 segue o mesmo princípio de reprodução, a diferença fica por conta dos pais. Na mutação 1, os pais são os 10 melhores conjuntos (passo 6), na mutação 2, os pais são os filhos gerados do acasalamento (passo 7.1). As duas mutações ocorrem com a mesma probabilidade de 0,25. O gene que será mutado é escolhido utilizando uma rotina randômica. Se o gene for selecionado, é escolhido um novo valor para este gene seguindo a mesma faixa de valores do passo 2;

7.3) Os novos filhos são criados seguindo as considerações do passo 2.

O programa computacional foi implementado no compilador visual Fortran 6.6.

Resultados

Para solucionar as equações do modelo matemático proposto é necessário saber os valores de todos os parâmetros cinéticos, assim como os dados das concentrações iniciais de todos os compostos envolvidos. Os valores destas constantes foram obtidas através do método de otimização, descrito na seção de materiais e métodos, tendo como base os valores obtidos experimentalmente de saturação de hemoglobina por tempo com concentrações iniciais de oxigênio e Hb_4 conhecidas [6]. Foram utilizados quatro diferentes valores de concentração inicial de oxigênio para a mesma concentração de Hb_4 , nas figuras 2 – 5 são apresentados os perfis dinâmicos da saturação de Hb_4 , onde é feita a comparação entre os dados experimentais e as curvas simuladas resultante obtidas por Gibson [5], e pela técnica de otimização apresentada neste trabalho. Na Figura 2, a concentração inicial de Hb_4 e O_2 são respectivamente, 41,5 μM em heme e 224 μM .

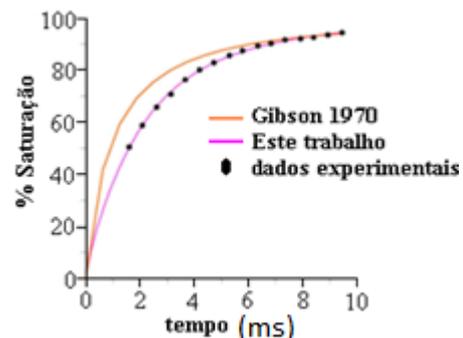


Figura 2: Saturação Hb_4 x tempo, $C_{O_2}^{ini} = 224\mu M$.

O conjunto das constantes cinéticas obtidos por Gibson, não são os mais adequados para descrever o perfil de saturação. Enquanto que os resultados obtidos neste trabalho são mais coerentes com os dados experimentais, isto pode ser novamente observado na Figura 3. Nesta simulação a concentração inicial de Hb₄ e O₂ são respectivamente, 41,5 μM em heme e 172 μM

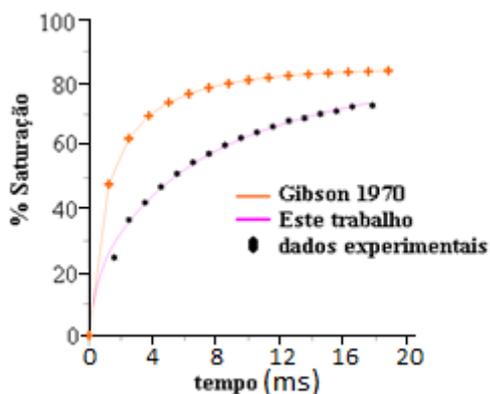


Figura 3: Saturação Hb₄ x tempo, C_{O₂}ⁱⁿⁱ = 172 μM.

Na Figura 4, a concentração inicial de Hb₄ e O₂ são respectivamente, 41,5 μM em heme e 90,2 μM.

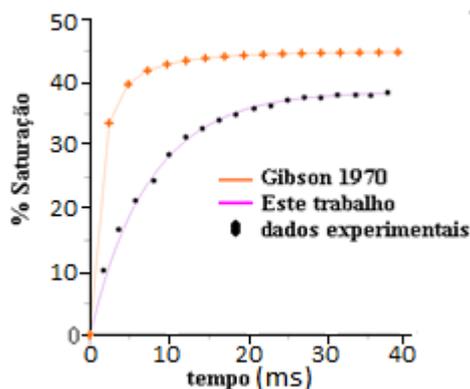


Figura 4: Saturação Hb₄ x tempo, C_{O₂}ⁱⁿⁱ = 90,2 μM.

Na Figura 5, a concentração inicial de Hb₄ e O₂ são respectivamente, 41,5 μM em heme e 32,46 μM.

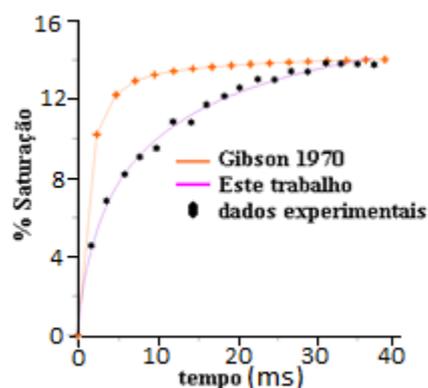


Figura 5: Saturação Hb₄ x tempo, C_{O₂}ⁱⁿⁱ = 32,46 μM.

Para cada valor de concentração inicial de oxigênio, foram obtidos oito parâmetros cinéticos da reação Hb₄-O₂. Nas tabelas 1 e 2, são apresentados respectivamente, os valores obtidos neste trabalho para as constantes de associação e para de dissociação.

Tabela 1: Valores das constantes cinéticas de associação otimizadas neste trabalho.

| C _{O₂} ⁱⁿⁱ [μM] | k _(1,2) [μmol/l] | k _(2,3) [μmol/l] | k _(3,4) [μmol/l] | k _(4,5) [μmol/l] |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 224,0 | 11,25 | 4,086 | 8,99 | 18,93 |
| 172,0 | 3,1661 | 9,9602 | 787,0 | 427,00 |
| 90,20 | 0,7296 | 341,22 | 112,03 | 60,486 |
| 32,46 | 6,174 | 29,21 | 6,76 | 12,14 |

Tabela 2: Valores das constantes cinéticas de dissociação otimizadas neste trabalho.

| C _{O₂} ⁱⁿⁱ [μM] | k _(2,1) [s ⁻¹] | k _(3,2) [s ⁻¹] | k _(4,3) [s ⁻¹] | k _(5,4) [s ⁻¹] |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 224,0 | 0,427 | 0,112 | 350,9 | 32,86 |
| 172,0 | 1811,1 | 0,837 | 499,62 | 890,13 |
| 90,20 | 1559,9 | 1775,0 | 492,16 | 1800,6 |
| 32,46 | 1942,3 | 335,27 | 3,229 | 17,080 |

Gibson utilizou os mesmos valores das constantes cinéticas para todas as concentrações iniciais de oxigênio. Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os valores determinados por Gibson [6].

Tabela 3: Valores das constantes cinéticas de associação otimizadas por Gibson.

| Associação [μmol/l] | k _(1,2) | k _(2,3) | k _(3,4) | k _(4,5) |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 17,70 | 33,20 | 4,89 | 33 |

Tabela 4: Valores das constantes cinéticas de dissociação otimizadas por Gibson.

| Dissociação [s ⁻¹] | k _(2,1) | k _(3,2) | k _(4,3) | k _(5,4) |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 1900 | 158,0 | 539 | 70 |

A literatura diz que a maior parte do oxigênio está associada à molécula de hemoglobina na forma de Hb₄O₈. Na Figuras 7 o perfil de concentração dinâmico de formação dos intermediários da reação, Hb₄O₂, Hb₄O₄, Hb₄O₆ e Hb₄O₈, e o consumo de Hb₄ e O₂. A concentração inicial de Hb₄ livre é de 2,2 mol/ml e de oxigênio de 1,45 x 10⁻⁷ mol/ml, as quais são as concentrações encontradas normalmente nas artérias. Logo que a reação é iniciada, t ≤ 0,01 μs, nota-se com clareza a variação das concentrações tanto dos reagentes quanto dos produtos intermediários da reação, Figura 6. A concentração de Hb₄O₂, Hb₄O₄ e Hb₄O₆ são baixas para todas as concentrações de oxigênio. Isto é consistente com o conhecimento de que as moléculas com dois O₂ ligam-se mais lentamente do que com três, e quando o último O₂ se liga, ela é quase instantânea. A cinética da decomposição dos intermediários é muito rápida, como sugere a pequena inclinação das curvas. O estado estacionário para os intermediários é atingido em

poucos micro segundos, ressaltando a dinâmica da reação entre o oxigênio e a hemoglobina. O sistema pode ser considerado em equilíbrio após 8×10^{-5} s, neste ponto, a concentração de Hb_4O_8 equivale a 77% das concentrações de todos os intermediários, o que confirma os dados da literatura.

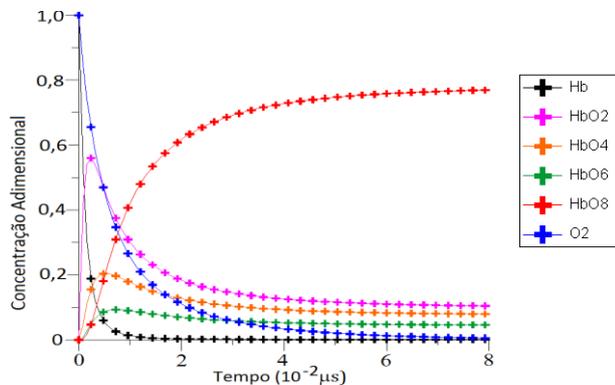


Figura 6 – Perfil dinâmico da formação dos intermediários da reação Hb-O₂, tempo 8×10^{-5} s.

A cinética da reação é satisfeita, visto que são reações reversíveis e que as associações são muito mais rápidas que as dissociações. Isso condiz com a oxigenação tecidual, cujo objetivo final é manter concentrações adequadas de oxigênio nos tecidos.

Discussão

A reação entre a hemoglobina e o oxigênio possui uma cinética muito rápida, o que dificulta o detalhamento do seu mecanismo. Outra dificuldade é que apesar de parecer homogênea, esta reação, mostra uma aceleração e desaceleração à medida que a mesma acontece, fato este constatado experimentalmente [9], onde observaram que o seu início é extremamente rápido. Estes autores concluíram que cada etapa favorece a etapa seguinte, de modo que as constantes de velocidade das reações seguem valores crescentes. Como cada uma destas etapas ocorre por uma reação reversível, o conjunto exige a determinação de oito parâmetros cinéticos, os dados experimentais necessários para a obtenção destes são de difícil obtenção uma vez que estes tem forte interdependência. Além disso, a obtenção dos parâmetros a partir dos dados experimentais exige um procedimento de otimização cuidadoso, em razão dos inúmeros mínimos locais existentes na superfície solução. Por estes motivos a literatura é escassa nesta informação.

Na maioria dos estudos, devido a complexidade de determinação de todas as constantes cinéticas de associação e dissociação, a reação é simplificada para uma única etapa, sem a formação dos intermediários, com isto é utilizado um valor global as constante de associação e dissociação.

Na simulação do modelo matemático deste trabalho, verifica-se que os parâmetros obtidos pela técnica de otimização mostraram-se adequados para descrever o

comportamento das reações. Os resultados obtidos dos perfis de concentrações dos intermediários demonstram que a velocidade da reação de associação é extremamente rápida na presença de alta concentração de oxigênio livre, confirmando o que é observado nos capilares pulmonares. Outra característica desta reação é a cooperatividade, isto pode ser confirmado, visto que a porcentagem do intermediário completamente saturado, Hb_4O_8 , para uma concentração inicial de hemoglobina livre de 2,2 mol/ml no estado estacionário é de 77%.

Concluindo, neste trabalho se propôs valores para todas as constantes cinéticas, obtidas pela otimização dos dados experimentais, utilizando o método de algoritmo genético. Os resultados obtidos, mostram que os valores obtidos para estas constantes são adequados, uma vez que a porcentagem de saturação de hemoglobina é compatível com os dados experimentais e o perfil de concentração de todos os intermediários das reações está de acordo com o esperado.

Agradecimentos

Cnpq e Capes pelo auxílio financeiro.

Referências

- [1] Dash, R.K.E Bassingthwaight, J.B. (2006) "Simultaneous blood-tissue exchange of oxygen, carbon dioxide, bicarbonate, and hydrogen ion" *Annals of Biomedical Engineering*, v. 34, n. 7, p.1129-1148.
- [2] Greenburg, A.G. (2009) "The ideal blood substitute" *Critical. Care Clinic*. v. 25, n. 2, p. 415-424, abril.
- [3] Hill, A.V. (1910) "The possible effects of the aggregations of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves" *Journal of Physiology*, v. 40, p. 4-7.
- [4] Adair, G.S. (1925) "The hemoglobin system" *The Journal of Biological Chemistry*, v. 63, p. 529-545.
- [5] Waltemath, C.L. (1970) "Oxygen, uptake, transport, and tissue utilization" *Anesthesia and Analgesia*, v. 49, p. 184-203.
- [6] Gibson, Q.H. (1970) "The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basic of the effect of salt on binding of oxygen" *The Journal of Biological Chemistr.*, v. 245, p. 3285-3288.
- [7] Eaton, W.A., Henry, E.R., Hofrichter, J., Mozzarelli, A. (1999) "Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?" *Naure. Structural Bioogyl.*, v.6, n. 4, p.351-358, abril.
- [8] Espósito, B.P. (2011) "Ferro um metal que vale ouro". Disponível em http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=ferro_um_metal_que_vale_ouro. Acesso em 14 mar. 2012.
- [9] Sawicki, C.A., Gibson, Q.H. (1976) "Quaternary conformational changes in human hemoglobin studied by laser photolysis of carboxyhemoglobin" *The Journal of Biological Chemistry.*, v. 251, p.1533-1542.