

ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE DESOXIGENAÇÃO DA HEMOGLOBINA PELO MÉTODO DE MISTURA RÁPIDA COM FLUXO INTERROMPIDO NO EQUIPAMENTO STOPPED FLOW MIXER 4000/S

A. TEIXEIRA¹, M. P. de SOUZA¹, T. A. P. BARTIÊ¹, A. BOLZAN¹ e L. T. PINTO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: adrineuro@yahoo.com.br

RESUMO – A reação química da hemoglobina com oxigênio é essencial para manter a homeostase do organismo e sobrevivência das células. Partindo desse conhecimento, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo experimental, elaborado para o estudo da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido, a fim de obter dados para uma futura otimização dos parâmetros de um modelo matemático que descreve esse fenômeno biológico. Devido à rapidez com que ocorre a ligação da hemoglobina ao oxigênio (milissegundos), faz-se necessário a utilização de um equipamento como o Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM – 4000/S) para que se obtenha uma análise fidedigna. Vale a pena salientar que a reação não ocorre em apenas uma etapa, ou seja, uma reação de pseudo-primeira ordem não é suficiente para descrever toda a reação de desoxigenação. Por esse motivo, foi considerado esse tipo de modelo somente para poder validar o protocolo experimental proposto e obter os valores de $k_{off\ 10} = 59,9\ s^{-1}$, $k_{off\ 20} = 65,0\ s^{-1}$, $k_{off\ 30} = 64,0\ s^{-1}$, $k_{off\ 40} = 63,1\ s^{-1}$, $k_{off\ 50} = 64,0\ s^{-1}$, resultando em um k_{off} médio de $63,1\ s^{-1}$. O presente trabalho mostrou-se eficiente para o estudo cinético da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina, sendo possível analisar a dinâmica dessa reação complexa.

1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina humana (Hb), consiste em um sistema carregador natural de oxigênio, transportando aproximadamente 97% desse gás para o organismo, facilitando sua captação nos capilares pulmonares e sua liberação nos capilares teciduais (ARNONE, 1974; THOMAS; LUMB, 2012; WALTEMATH *et al.*, 1970). Esse tetrâmero é constituído por uma parte proteica que são grupamentos de aminoácidos divididos em $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$ chamados de globinas, e cada uma dessas globinas apresenta uma porção não proteica constituída por um grupo prostético heme ligado centralmente ao átomo ferroso (PERUTZ *et al.*, 1964; PERUTZ, 1979; THOMAS; LUMB, 2012). Cada íon ferroso (Fe^{2+}) pode combinar-se reversivelmente ao oxigênio (O_2) e possui seis sítios de coordenações: estabelece quatro ligações planares com cada um dos átomos de nitrogênio do anel

protoporfirínico; a quinta união ocorre com o radical imidazólico da histidina proximal (His F8) e a sexta ligação pode ocorrer de duas formas, oxigenando a Hb quando o oxigênio acoplado a histidina distal (His E7) se liga ou desoxigenando quando a Hb está livre (PEÑUELA, 2005; PERUTZ *et al.*, 1964). A reação química entre a hemoglobina e o oxigênio é essencial para manter a homeostase orgânica e conseqüentemente, minimizar o desencadeamento de patologias tais como cardiopatias, hemoglobinopatias, acidentes vasculares cerebrais dentre outras (BLAU; STAMATOYANNOPOULOS, 1994). Embora já se encontre na literatura uma proposta amplamente aceita na comunidade científica do mecanismo da reação entre a Hb e o oxigênio, ilustrado na Figura 1, os valores das constantes cinéticas ainda são discrepantes. Essa discrepância ocorre em função da utilização de equipamentos inadequados para as análises cinéticas, visto que a alta velocidade com que ocorre a reação, em torno de 1 s, exige significativa precisão e alta velocidade de detecção.

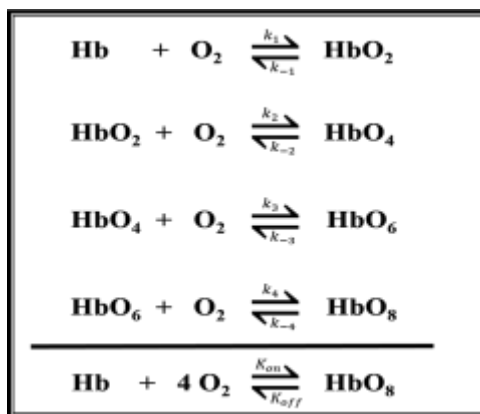


Figura 1 – Esquema das quatro etapas do mecanismo da reação entre Hb e O₂ e sua equação global.

Devido à rapidez com que ocorre a ligação da hemoglobina ao oxigênio, faz-se necessário a utilização de um método adequado em um equipamento apropriado para que se obtenha uma análise confiável dessa dinâmica. A fim de atingir esse objetivo, optou-se por utilizar o equipamento Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM – 4000/S), que utiliza o método de mistura rápida com fluxo interrompido e possui um tempo de análise na ordem de grandeza de milissegundos (BERGER *et al.*, 1967; BATISTELA *et al.*, 2006; FRESKGARD *et al.*, 1992).

Segundo a literatura, existe uma variedade de processos fisiológicos que ocorrem na faixa de tempo de milissegundos e como a hemoglobina participa de reações dessa ordem, o equipamento SFM-4000/S é uma alternativa promissora, que além de fornecer uma automação apropriada garantindo eficiência na mistura dos reagentes, possibilita analisar micro volumes de soluções homogêneas e sem formação de bolhas, minimizando interferências. Nessa perspectiva, o presente trabalho relata o desenvolvimento do protocolo experimental, elaborado para o estudo da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina no SFM-4000/S, cujos resultados obtidos serão utilizados futuramente para otimização dos parâmetros de um modelo matemático que descreve esse fenômeno biológico (BERGER *et al.*, 1967; BATISTELA *et al.*, 2006; PEÑUELA, 2005).

2. METODOLOGIA

Preparação e purificação da oxi-hemoglobina: inicialmente, foi dissolvido 200 mg de meta-hemoglobina liofilizada (H7379 - Sigma Aldrich) em 10 mL de tampão hepes 50 mM pH 7,4 qsp, a fim de ser purificada em oxi-hemoglobina pelo método de *Cromatografia Líquida por Gel de Exclusão Molecular* (SEPHADEX G-25), de acordo com Dixon (1985). Em todo o processo foi utilizado o tampão hepes para equilibrar o pH 7,4 da resina sephadex G-25 (dentro da coluna). Antes de acrescentar 10 mL da meta-hemoglobina foi adicionado 2 mL de ditonito de sódio (agente redutor) e posteriormente o tampão. Após a redução da meta-hemoglobina em oxi-hemoglobina, a mesma é colocada em uma membrana semipermeável de diálise, a qual contém poros com peso molecular de corte de 30 kDa (inferior a 64 kDa). Com o propósito de remover o excesso de ditonito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) para concluir o processo de purificação da oxi-hemoglobina, a amostra foi deixada em diálise prolongada por 24h contra um tampão hepes pH 7,4 (trocado três vezes), sob agitação e temperatura constante de 8°C (TSURUGA *et al.*, 1998; WEBER *et al.*, 2013). Depois de dialisada a oxi-hemoglobina foi quantificada segundo o método de Drabkin e Austin (1935). A verificação do espectro de absorção foi realizada para confirmar as diferentes formas heme-estruturais por meio de varredura, utilizando um comprimento de onda entre 390 nm a 650 nm mensuradas no espectrofotômetro *SpectraMax Plus 384* (NAOUM *et al.*, 2004).

Análise experimental da desoxigenação da oxi-hemoglobina: Segundo Dalziel e O'Brien (1957), o ditonito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) é o reagente mais comum utilizado para a desoxigenação da oxi-hemoglobina e redução dos pigmentos heme. Hartridge e Roghton (1923) foram os pioneiros no estudo da desoxigenação da oxi-hemoglobina com excesso de ditonito de sódio através do método de mistura rápida. O SFM – 4000/S, que utiliza esse método, é composto por quatro seringas independentes (S1, S2, S3 e S4) onde são armazenadas as substâncias que participarão da reação química, conforme mostrado na Figura 2a. Na Figura 2a também podem ser visualizados os três misturadores (M1, M2 e M3) de elevada eficácia, onde o M1 é responsável por misturar as soluções das seringas S1 e S2 para a realização do branco no equipamento (com o tampão hepes e ditonito de sódio). O M2 está ligado diretamente a seringa S3 (ditonito de sódio) e o M3 a seringa S4 (oxi-hemoglobina) que fica localizado abaixo da microcubeta, o qual é responsável pela mistura completa dos reagentes finalizando a homogeneização. Uma das microcubetas disponíveis é a $\mu\text{FC 08}$, com um caminho óptico de 0,8 mm, e um tempo morto (t_{morto}) de 1,6 ms, que significa o tempo entre a mistura e a aquisição dos dados. Todos os ajustes são feitos por um software, Bio-Kine 32 versão 4.74, interligado ao próprio equipamento (BERGER *et al.*, 1967; BATISTELA *et al.*, 2006; FRESKARD *et al.*, 1992). No SFM 4000/S foram mensurados todos os experimentos, desde a curva de calibração da oxi-hemoglobina até sua desoxigenação com o agente redutor ditonito de sódio (8,6 mM) pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido, utilizando um tempo morto (t_{morto}) de 1,6 ms. O fluxograma do protocolo experimental pode ser evidenciado na Figura 2b, onde são elucidados os passos para a conclusão da desoxigenação da oxi-hemoglobina.

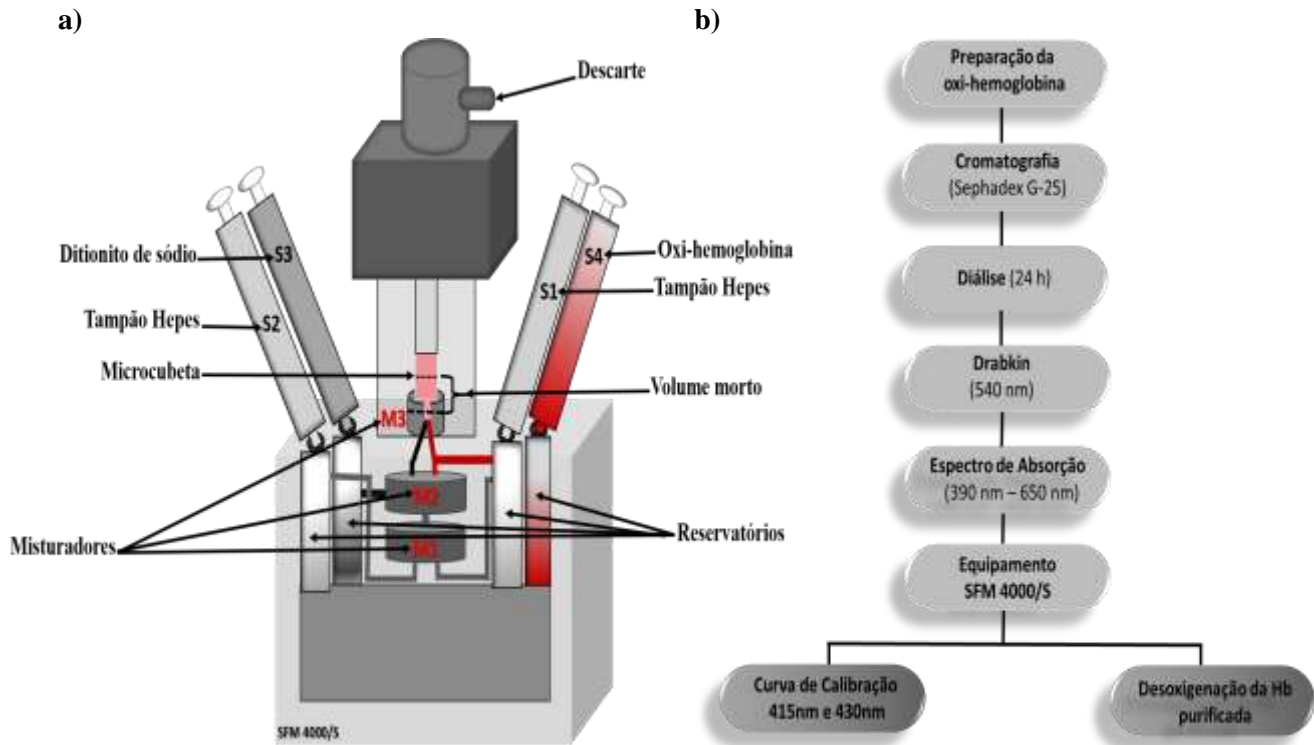


Figura 2 – a) Representação do equipamento Stopped Flow Mixer 4000/S com seus três misturadores do tipo Berger Ball (M1, M2 e M3), com as quatro seringas e seus respectivos reagentes para a reação de desoxigenação. b) Fluxograma das etapas do desenvolvimento experimental, desde a purificação da oxí-hemoglobina até sua desoxigenação pelo método de mistura rápida com fluxo interrompido no equipamento SFM 4000/S.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na Figura 3, o espectro de absorção da meta e oxí-hemoglobina apresentam os picos da banda de Soret e da banda Q, assim como o trabalho de Naoum *et al.* (2004). O gráfico de absorbância em função do comprimento de onda visualizado na Figura 3 identifica cada estrutura separadamente por meio de varredura (390 nm a 650 nm), comprovando que a meta-hemoglobina inicialmente preparada foi reduzida à oxí-hemoglobina (oxiHb) após sua purificação. Por conseguinte, pode ser perfeitamente utilizada no experimento de mistura rápida com fluxo interrompido para a desoxigenação da oxí-hemoglobina (JIA *et al.*, 2004). Com o objetivo de conseguir o melhor sinal e diminuir interferentes foi usado o valor da banda de Soret em todas as análises realizadas no SFM 4000/S.

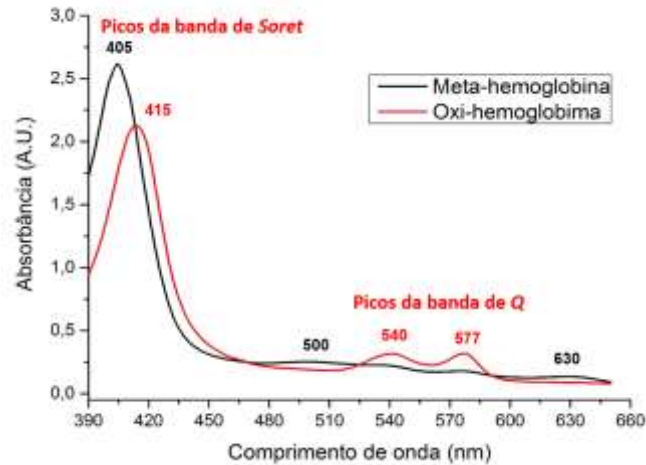


Figura 3 - Determinação do espectro de absorção da meta-hemoglobina e oxi-hemoglobina.

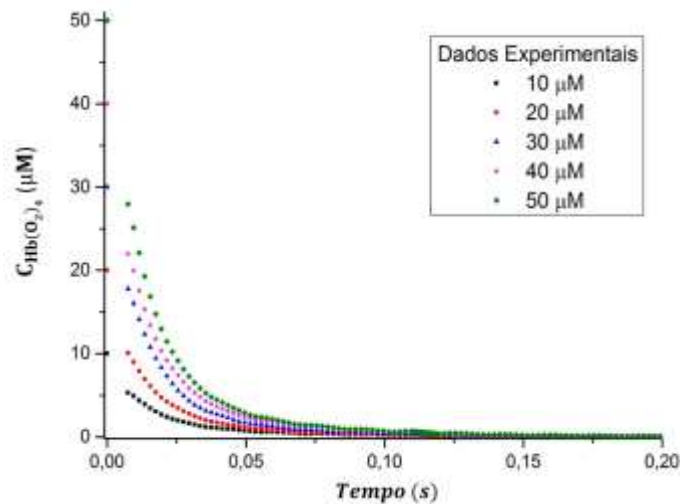


Figura 4 – Concentração de oxi-hemoglobina ao longo do tempo na reação de desoxigenação.

Embora a desoxigenação seja uma reação com quatro etapas reversíveis, autores como Jia *et al.* (2013) sugerem que, quando se utiliza um excesso de ditionito de sódio, a mesma possa ser aproximada em apenas uma etapa irreversível cuja cinética seja de pseudo-primeira ordem, conforme Equação 1, cuja solução analítica é $C_{Hb(O_2)_4} = C_{Hb(O_2)_4}^{inicial} \cdot e^{-k_{off} \cdot t}$. Deste modo, cada uma das curvas representadas no gráfico da Figura 4 foram ajustadas com uma exponencial decrescente para poder se estimar as constantes de dissociação (k_{off}) separadamente, conforme pode ser observado na Figura 5. Os resultados obtidos foram: $k_{off\ 10} = 59,9\ s^{-1}$, $k_{off\ 20} = 65,0\ s^{-1}$, $k_{off\ 30} = 64,0\ s^{-1}$, $k_{off\ 40} = 63,1\ s^{-1}$,

$k_{off\ 50} = 64,0\ s^{-1}$, resultando em uma média do k_{off} de $63,1\ s^{-1}$.

$$\frac{dC_{Hb(O_2)_4}}{dt} = -k_{off} C_{Hb(O_2)_4} \quad (1)$$

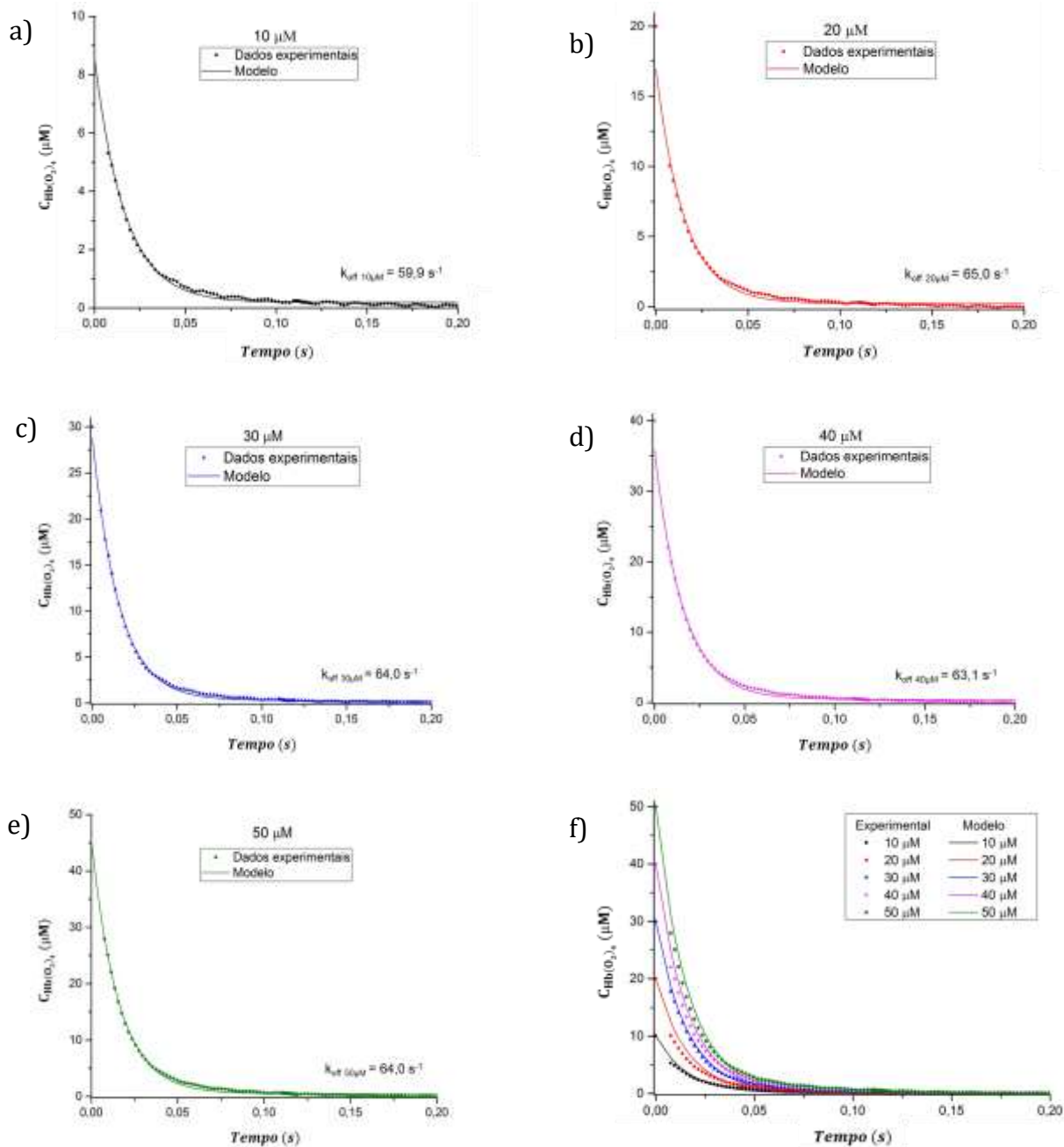


Figura 5 – Pontos experimentais e curvas ajustadas considerando reação pseudo primeira-ordem para a) $10\ \mu M$, b) $20\ \mu M$, c) $30\ \mu M$, d) $40\ \mu M$, e) $50\ \mu M$. f) Comparação do modelo com experimento.

Após a determinação do k_{off} médio de $63,1 \text{ s}^{-1}$, fez-se a comparação entre os pontos experimentais e o modelo matemático, conforme pode ser observado na Figura 5f. É importante destacar que a reação não ocorre em apenas uma etapa, ou seja, uma reação de pseudo-primeira ordem não é suficiente para descrever a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina satisfatoriamente. Justamente por esse motivo, torna-se necessária a otimização das quatro constantes cinéticas para um modelo mais fidedigno, que será realizada posteriormente pelos autores.

O presente trabalho mostrou-se eficiente para o estudo cinético da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina, pois, através dele, foi possível analisar a dinâmica da reação, que de fato ocorre em menos de 1 s. A consideração de que a reação seja de pseudo-primeira ordem não é satisfatória, tornando-se imprescindível a utilização de um modelo mais completo cujas constantes devem ser otimizadas futuramente.

4. REFERÊNCIAS

ARNONE, A. Mechanism of Action of Hemoglobin. *Annu. Rev. Med.*, v. 15, p. 123-130, 1974.

BATISTELA, V. R., TESSARO, A. L.; SOARES, R. R. S.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. Um aparato para monitorar reações rápidas: Um "stopped flow" artesanal de baixo custo. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1101-1105, 2006.

BERGER, R. L.; ANTONINI, E.; BIWNOVI, M.; WYMAN, J.; ROSSI-FANELLI, A. Observations on the Kinetics of the Reaction of Hemoglobin with Oxygen. 3. *J. Biol. Chem.*, v. 242, p. 4841-4843, 1967.

BLAU, C.A.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Hemoglobin switching and its clinical implications. *Cur. Opinion in Hematology*, v. 1, n. 2, p.136-42, 1994.

DIXON, H.B.F. Gel Filtration of Haemoglobin. *Biochem. Educ.*, v. 13, p. 4, 1985.

DRABKIN, D.L. and AUSTIN, J.H. *J. Biol. Chem.*, v. 112, p. 51, 1935.

FRESKGDARD, Per-Ola; BERGENHEM, N.; UNO C. Versatile Stopped-flow Apparatus with Adjustable Pistons. *Anal. Chim. Acta*, v. 269, p. 143-148, 1992.

JIA, Y; WOOD, F.; MENU, P.; FAIVRE, B.; CARON, A.; ALAYASH A. I. Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1672, p. 164– 173, 2004.

JIA, Y; WOOD, F.; BUEHLER, P.W.; ALAYASH A. I. Haptoglobin Preferentially Binds b but Not a Subunits Cross-Linked Hemoglobin Tetramers with Minimal Effects on Ligand and Redox Reactions. *Plos One*, v. 8, n. 3, p. e59841, 2013.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Rev. Bras. Hemat. Hemot.*, v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

PEÑUELA, O.A. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, v. 36, n. 03, 2005.

PERUTZ, M. F.; BOLTON, W.; DIAMOND, R.; MUIRHEAD, H. AND WATSON, H. C. Structure of Hemoglobin. *Nature (London)*, v. 203, p. 687-690, 1964.

PERUTZ, M. F. Regulation of Oxygen Affinity oh Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 48, p.327-386, 1979.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of Haemoglobin. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, v. 12, n. 05, p. 251-256, 2012.

TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; HACHIMORI, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 15, p. 8607–8615, 1998.

WALTEMATH, C.L. Oxygen, Uptake, Transport, and Tissue Utilization. Journal: *Anesthesia and Analgesia*, v. 49, n.01, p. 184-20, 1970.

WEBER, R.E.; FAGO, A.; MALTE, H.; STORZ, J. F.; GORR, T. A. Lack of conventional oxygen-linked proton and anion binding sites does not impair allosteric regulation of oxygen binding in dwarf caiman hemoglobina. *Am. J. Physiol.* v. 305, p. R300-R312, 2013.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

