



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA

BARTIÊ TAP¹, MELLO AT¹, BOLZAN A¹ e PINTO LT¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: leonel.t.pinto@ufsc.br

RESUMO – *A reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina tem sido tratada como de pseudo-primeira ordem, apesar de os dados experimentais não serem coerentes com este modelo para saturação acima de 70%. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é estimar os quatro coeficientes cinéticos do modelo que leva em conta as quatro etapas sucessivas da reação. Para tornar isto possível foram também otimizados os coeficientes das curvas de calibração dos compostos intermediários. Na comparação entre os valores teóricos e experimentais obtidos em trabalho preliminar já publicado, foi utilizado o Método de Otimização de Busca Unidirecional, que garante a obtenção de mínimos locais. O conjunto selecionado como representativo dos melhores tem os seguintes valores: $k_{-4} = 46,51 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$; $k_{-3} = 210,65 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2} = 278,52 \pm 0,66 \text{ s}^{-1}$; $k_{-1} = 388,37 \pm 0,83 \text{ s}^{-1}$. Ele é coerente pelo ordenamento das constantes e por estar em acordo com princípio da cooperatividade. O valor de k_{-4} na mesma ordem de grandeza do k_{off} , indica a etapa limitante da reação.*

1. INTRODUÇÃO

A modelagem matemática da distribuição do oxigênio no corpo pode auxiliar o diagnóstico e tratamento de diversas doenças (CEBRAL *et al.*, 2011). Um dos fenômenos a ser descrito neste modelo é a reação entre a hemoglobina e o oxigênio (LÜCKER *et al.*, 2015). Esta reação ocorre em quatro etapas sucessivas e reversíveis (ADAIR, 1925; GIBSON 1970). Gibson (1970) foi o único a estimar as oito constantes cinéticas desta reação. Seus resultados, porém, nunca foram reproduzidos ou analisados criticamente.

Avaliar experimentalmente a reação entre hemoglobina e oxigênio não é trivial, por isso costuma-se analisar as etapas de oxigenação e desoxigenação separadamente. O estudo da desoxigenação é mais comum, todavia, os pesquisadores consideram-na como uma reação de pseudo-primeira ordem (JIA *et al.*, 2013). Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho consiste na otimização das quatro constantes cinéticas da desoxigenação da oxi-hemoglobina utilizando os resultados experimentais apresentados por Teixeira *et al.* (2018). Além disso, é necessário estimar os coeficientes angulares das curvas de calibração dos compostos intermediários, uma vez que a absorbância de cada um deles contribui para a absorbância total mensurada experimentalmente.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

2. METODOLOGIA

A função objetivo do presente trabalho consiste na minimização da diferença entre os valores de absorvância experimentais ($Abs_{experimental}^i$), extraídos de Teixeira *et al.* (2018) e aqueles obtidos a partir do modelo matemático (Abs_{modelo}^i). Como foram avaliados cinco diferentes valores de concentração inicial de oxi-hemoglobina, soma-se essa diferença para cada um dos experimentos de modo que a função objetivo é descrita pela Equação 1.

$$F.O. = \min \left(\sum_{n_{experimento}=1}^5 (Abs_{experimental}^i - Abs_{modelo}^i)^2 \right) \quad (1)$$

Conforme sugerido por Teixeira *et al.* (2018), todos os compostos envolvidos na reação ($Hb(O_2)_j, 0 \leq j \leq 4$) apresentam absorvância no comprimento de onda utilizado experimentalmente. Deste modo, a absorvância teórica é a soma da absorvância de cada um deles. Considerando linear a relação entre absorvância e concentração e coeficiente linear igual a zero, a Equação 2 pode ser utilizada para o cálculo da absorvância teórica.

$$Abs_{modelo}^i = \sum_{j=0}^4 a_j C_{Hb(O_2)_j}^i \quad (2)$$

Os valores de a_0 e a_4 foram estimados por Teixeira *et al.* (2018). Os outros coeficientes, a_1 , a_2 e a_3 foram otimizados. Para o cálculo das concentrações, foi empregado o método Euler simples para a solução numérica do conjunto de equações diferenciais, construídas a partir do mecanismo da reação proposto por Gibson (1970).

Foram gerados randomicamente, a partir de uma distribuição equiprovável, quarenta mil conjuntos contendo os parâmetros do modelo. O espaço de busca para as constantes cinéticas corresponde ao intervalo entre 0 a 2000 s^{-1} . Para os coeficientes angulares, o espaço de busca consistiu dos valores intermediários entre os coeficientes angulares das curvas de calibração da oxi e da desoxi-hemoglobina. Testaram-se três alternativas: 1) sem restrição; 2) ordenamento ($a_0 < a_1 < a_2 < a_3 < a_4$); 3) ordenamento linear ($a_0 < a_1 < \frac{1}{3}(a_4 - a_0)$ e $\frac{1}{3}(a_4 - a_0) < a_2 < \frac{2}{3}(a_4 - a_0)$ e $\frac{2}{3}(a_4 - a_0) < a_3 < a_4$). As duas últimas restrições são coerentes uma vez que a absorvância é função do arranjo estrutural das moléculas. Como na desoxigenação da oxi-hemoglobina o arranjo é sequencialmente modificado, esse ordenamento na absorção da radiação é coerente. Após a geração dos pontos de partida, calculou-se o argumento da função objetivo. Posteriormente, selecionou-se os 400 melhores conjuntos para execução da busca unidirecional com o intuito de se encontrar mínimos locais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a execução da busca unidirecional, cada parâmetro apresentou três regiões de valores (0-50; 100-600; = 2000). Em cada uma delas foram calculadas as médias dos parâmetros, conforme apresentado na Figura 1a. Na Figura 1b pode-se observar que, para as três restrições, os parâmetros k_{-1} , k_{-2} e k_{-3} se concentram na região 2. Já o parâmetro k_{-4} concentra-se na região 3 para as restrições 1 e 3, enquanto que na restrição 2 ele se divide nas regiões 2 e 3. Um aspecto interessante dos resultados obtidos é com relação ao ordenamento dos valores médios dos parâmetros cinéticos na região 2 quando se aplica a restrição 3, ou seja,

uma imposição de uma determinada restrição aos coeficientes angulares das curvas de calibração acarretou no ordenamento dos coeficientes cinéticos ($k_{-4} < k_{-3} < k_{-2} < k_{-1}$). A relevância dessa constatação é evidenciada quando se analisa a hipótese da cooperatividade, cuja ideia é que há uma afinidade diferenciada do oxigênio em cada estado conformacional da hemoglobina (NAGATOMO *et al.*, 2015). Segundo Hellmann (2011), isso acarreta em um comportamento auto catalítico, com aumento da velocidade da reação de desoxigenação ao longo do tempo. Essa conclusão está em acordo com o ordenamento observado

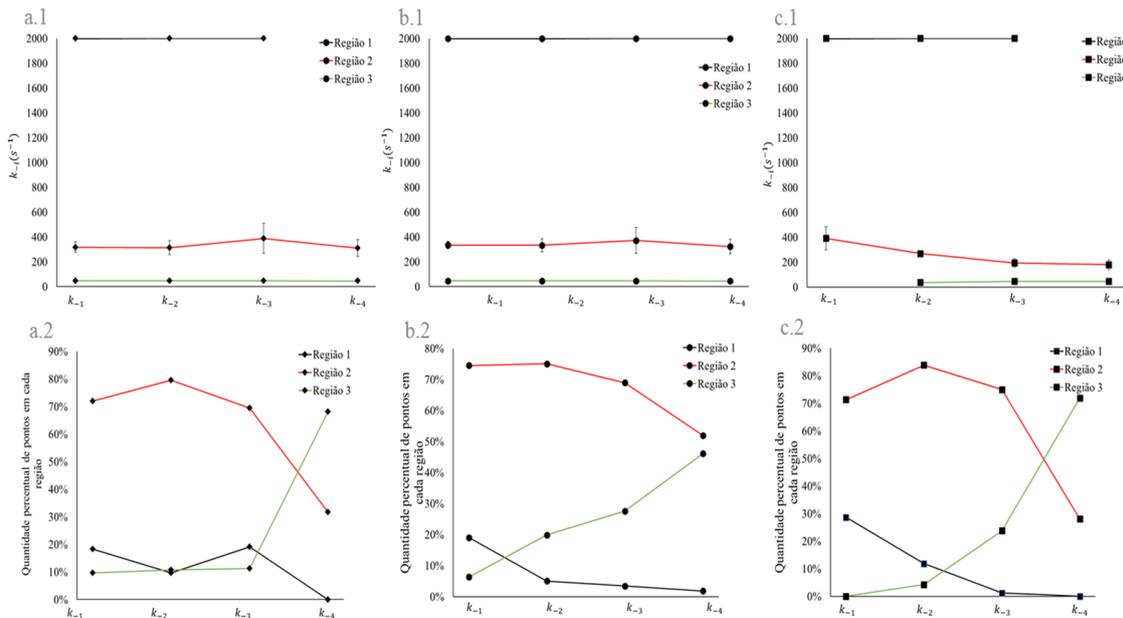


Figura 1 – Valores médios das constantes cinéticas em cada região (1), bem como a quantidade percentual de pontos em cada região (2) para (a) Restrição 1; (b) Restrição 2 e (c) Restrição 3.

Uma análise pertinente que reforça o ordenamento das constantes cinéticas consiste na seleção dos conjuntos da restrição 3 em maior quantidade: aqueles cujo k_{-4} concentra-se na região 3 (72,0%). Observa-se, na Figura 2a, ordenamento das constantes cinéticas.

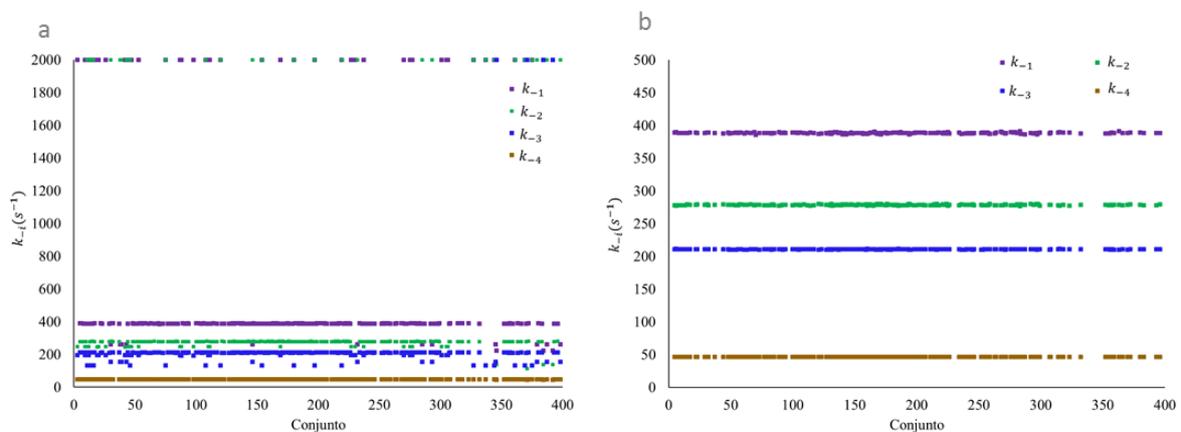


Figura 2 – (a) Valores das constantes cinéticas obtidas após a execução da busca unidirecional para a restrição 3. Eliminando os conjuntos que apresentam algum valor na faixa de 2000, obtém-se a parte (b) da figura.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Desprezando-se dessa análise os conjuntos que contém algum valor igual a 2000 s^{-1} , restando ainda 54,3% dos resultados, o ordenamento é mais evidente, conforme apresentado na Figura 2b, possibilitando se estipular um valor para cada constante: $k_{-4} = 46,51 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$; $k_{-3} = 210,65 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$; $k_{-2} = 278,52 \pm 0,66 \text{ s}^{-1}$; $k_{-1} = 388,37 \pm 0,83 \text{ s}^{-1}$.

Em alguns casos, a velocidade global da reação pode ser aproximada pela velocidade da etapa limitante (HANG, 2005). Segundo a hipótese da cooperatividade, a etapa limitante da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina é a primeira, uma vez que a hemoglobina no estado relaxado tem maior afinidade com o oxigênio, dificultando sua liberação (BELLELLI, 2010). Caso a etapa limitante da reação seja de fato a prevista pela hipótese da cooperatividade, k_{off} deveria ser da mesma ordem de grandeza que k_{-4} . O k_{off} para os dados experimentais obtidos é igual a $35,2 \text{ s}^{-1}$ (Teixeira *et al.*, 2018), corroborando essa ideia.

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a otimização das constantes cinéticas não é trivial e requer uma análise exaustiva, haja vista os diversos conjuntos obtidos. Incorporar outros critérios na análise nos permite encontrar um conjunto coerente. Ao restringir os resultados, foi possível encontrar um resultado coerente com o princípio da cooperatividade e com a velocidade limitante da reação. É necessário também fazer uma avaliação dos coeficientes angulares obtidos, o que será discutido em um trabalho futuro.

6. REFERÊNCIAS

- ADAIR GS, The hemoglobin system. VI: The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J Biol Chem*, v. 63, p.529-545, 1925.
- BELLELLI A, Hemoglobin and cooperativity: experiments and theories. *Current Protein and Peptide Science*, v. 11, p.2-36, 2010.
- CEBRAL JR, MUT F, RASCHI M, SCRIVANO E, CERATTO R, LYLYK P, PUTMAN CM, Aneurysm rupture following treatment with flow-diverting stents: computational hemodynamics analysis of treatment. *Am J of Neuroradiol*, v. 32, p. 27-33, jan. 2011.
- GIBSON QH, The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *J Biol Chem*,v.245,n.13,p.3285-3288, 1970.
- HANG R, *Physical Chemistry for Biosciences*. University Science Books, 2005. 678 p.
- HELLMANN N, Control of kinetics by cooperative interactions. *Iubmb*,v.63,n.5,p.329-336, 2011.
- JIA, Y, WOOD F, BUEHLER PW, ALAYASH AI, Haptoglobin preferentially binds β but not α subunits cross-linked hemoglobin tetramers with minimal effects on ligand and redox reactions. *Plos One*, v. 8, n. 3, mar. 2013.
- LÜCKER A, WEBER B, JENNY P, A dynamic model of oxygen transport from capillaries to tissue with moving red blood cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 308, p. 206-216, 2015.
- NAGATOMO S, NAGAI Y, AKI Y, SAKURAI H, IMAI K, MIZUSAWA N, OGIURA T, KITAGAWA T, NAGAI M, An origin of cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin: different roles of α and β subunits in $\alpha_2\beta_2$ tetramer. *Plos One*,v.10, n.8,p.1-29, 2015.
- TEIXEIRA A, SOUZA MP, BARTIÊ TAP, BOLZAN A, PINTO LT, Theoretical and experimental contributions about the usual application of the pseudo-first order model in kinetic analysis of oxyhemoglobin deoxygenation. *The Pharmac and Chem J*, v.5, n.1, p. 123-135, 2018.