

Márcio Paiano de Souza

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA
CINÉTICA DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA
PELO MÉTODO DE FLUXO INTERROMPIDO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Arioaldo Bolzan

Florianópolis - SC
Junho/2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Márcio Paiano de
PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA CINÉTICA DE
DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA PELO MÉTODO DE FLUXO
INTERROMPIDO / Márcio Paiano de Souza ; orientador, Leonel
Teixeira Pinto ; coorientador, Ariovaldo Bolzan. -
Florianópolis, SC, 2016.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Protocolo de desoxigenação da
oxi-hemoglobina . 3. Método de mistura rápida com fluxo
interrompido. 4. Redução da meta-hemoglobina. 5. Purificação
da oxi-hemoglobina. I. Pinto, Leonel Teixeira. II. Bolzan,
Ariovaldo. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Márcio Paiano de Souza

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA
CINÉTICA DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA
PELO MÉTODO DE FLUXO INTERROMPIDO**

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Alda Paiano de Souza, por ter sempre acreditado em mim e não medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu pai, Hilário de Souza, por ter abandonado a vida difícil da lavoura para propiciar um futuro melhor aos seus filhos.

À Nanci Jorge de Aguiar e Ulysses Jorge de Aguiar pelo apoio, paciência e companheirismo de todas as horas.

À minha querida madrinha Gertrudes Paiano (in memorian), por toda sua dedicação e pelo seu carinho.

A João José de Aguiar (in memorian), pelas palavras de incentivo e conforto dadas durante a minha entrada no mestrado.

Ao Dr. André Bicalho de Barcelos (in memorian), pelas nossas conversas e também pela sua amizade, que mesmo de forma breve, lembrarei para o resto da minha vida.

À minha grande amiga, Adriana Teixeira, pela sua dedicação e incentivo, durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do NEUROLAB, Amanda, Brayan, Juliana, Thais e Thiago, pelo auxílio e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto, pela sua persistência para que eu não desistisse da conclusão deste trabalho.

Ao Laboratório INTELAB do Prof. Dr. Luismar Marques Porto, em especial aos doutorandos Karina Cesca e Guilherme Cola, cujo apoio foi fundamental para alcançar meus objetivos.

Ao Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (Labinc) do Prof. Dr. Ademir Neves juntamente com o doutorando Marcos Paulo da Silva.

Ao laboratório de Bioinorgânica e Equilíbrio do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz juntamente com o mestrando Anderson Bastos Pires.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A hemoglobina tem grande importância no processo de respiração celular e por esse motivo foi a proteína mais estudada durante o último século. Foi também a primeira molécula a ter sua estrutura desvendada utilizando-se de Raio-X. A cinética da reação de hemoglobina com oxigênio acontece de forma muito rápida, em milissegundos e deu início aos primeiros experimentos usando a técnica de mistura rápida. O fluxo interrompido consiste na mistura e injeção rápida de reagentes no interior de uma câmara de mistura, onde ocorre o início da reação após fechamento de uma eletroválvula que interrompe o fluxo. A partir desse momento são realizadas as leituras de absorvância ou fluorescência em função do tempo. Muitos trabalhos já foram realizados usando hemoglobina e um agente redutor, o ditionito de sódio. Porém a proposta do presente trabalho é avaliar o uso da meta-hemoglobina, a correta calibração do equipamento e a elaboração de um protocolo experimental no equipamento Stopped Flow Mixer (SFM-4000) que garanta uma mistura de forma homogênea sem cavitações resultando na desoxigenação da hemoglobina possibilitando a realização de análises futuras e cálculos de todas as etapas da reação. Os resultados obtidos nos experimentos em relação à constante de dissociação (k_{off}) se mostraram de acordo com a literatura obtendo um valor de $40,24 \text{ s}^{-1}$. O trabalho também comprovou que a meta-hemoglobina pode ser reduzida e utilizada para o estudo cinético com o oxigênio. No entanto, aproximar a reação de liberação de oxigênio como sendo de uma única etapa através de um cálculo de uma única constante de dissociação (k_{off}) proposto por um modelo de pseudo-primeira ordem, mostrou-se válido até certo período de tempo, mas quando o tempo foi diminuído para 0,1 segundo foi possível observar que o mesmo não se ajusta aos instantes iniciais da reação.

Palavras-chave: cinética, desoxigenação da hemoglobina, método de fluxo interrompido.

ABSTRACT

Hemoglobin has a great importance in the process of respiration of living beings and for this reason has been the most studied protein over the last century. It was the first molecule to have its structure unraveled by X-ray. The kinetic reaction of hemoglobin with oxygen occurs very quickly, in milliseconds, and for this reason in the first experiments the rapid mixing technique was used. In this technique, the reagents are injected into a mixing chamber where the reaction occurs early after closure of a stopping valve that interrupts the flow. From that moment the absorbance readings versus time is registered. Many studies have used hemoglobin in combination with the reducing agent sodium dithionite. Nevertheless, the purpose of this study is to evaluate the use of the methemoglobin, the correct calibration of the equipment and the development of an experimental protocol in Stopped Flow Mixer equipment (SFM-4000) to ensure a mix homogeneously without cavitation resulting in deoxygenation hemoglobin enabling the realization of further analysis and calculations of all stages of the reaction. The result obtained in the experiments in relation to the dissociation constant is in accordance with the literature obtaining a k_{off} of 40.24 s^{-1} . The work also proved that methemoglobin can be reduced and used to study the kinetics with oxygen. However, the approximation of reaction described by a single step for calculating the dissociation constant (k_{off}) proposed by a pseudo-first order kinetic model, proved to be valid until a certain period of time, but when the time was reduced to 0.1 second, it was possible to observe that it does not fit the initial stages of the reaction.

Keywords: kinetic, hemoglobin deoxygenation, stopped flow method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da hemoglobina no sistema sanguíneo.	27
Figura 2 - Representação da estrutura tridimensional da molécula de hemoglobina com suas quatro cadeias (duas α e duas β).	29
Figura 3 - Síntese das globinas após o nascimento do indivíduo.	30
Figura 4 - Representação estrutural do grupo heme composto por uma porfirina ligada a um átomo de ferro, com destaque para as histidinas proximal e distal. A histidina distal é onde se coordena o oxigênio molecular.	32
Figura 5 – Representação das formas oxi e desoxi-Hb. a) a conformação desoxigenada (estado T) diminui a afinidade pelo oxigênio. b) o relaxamento provocado pela ligação da primeira molécula de O_2 faz com que a afinidade pelo oxigênio aumente pelo movimento das globinas permitindo a total oxigenação da hemoglobina.	33
Figura 6 - Principal via de redução da meta-Hb no organismo.	34
Figura 7 - Espectro típico de absorbância de uma metaloproteína.	35
Figura 8 - Espectro de absorção das diferentes formas de hemoglobina.	36
Figura 9 - Relação da porcentagem de saturação de hemoglobina (Y) com a pressão de oxigênio (P_{O_2}), representando uma curva de forma sigmoidal.	37
Figura 10 – Gráfico de saturação da hemoglobina em função da pressão parcial de oxigênio com seus interferentes.	38
Figura 11 - Ligação da molécula de 2,3 – DPG a hemoglobina.	40
Figura 12 - Representação do método de mistura rápida de fluxo contínuo.	44
Figura 13 - Diagrama de funcionamento do método de mistura rápida com fluxo interrompido.	45
Figura 14 - Lâmpada de xenônio acrescida de mercúrio (Hg)	46
Figura 15 - Fluxograma das etapas da obtenção da hemoglobina pura.	51
Figura 16 – Coluna de resina Sephadex G – 25.	52
Figura 17 - A meta-Hb (cor castanho escuro) é reduzida a oxi-Hb (cor vermelho) após contato com DTS.	53
Figura 18 - Procedimento de diálise da Hb.	54
Figura 19 – Sequência das diluições para determinação da concentração de Hb pelo método de Drabkin.	55
Figura 20 - Representação do conjunto de componentes do equipamento <i>Stopped Flow Mixer</i> (SFM-4000/S).	57
Figura 21 - Sequência de configuração para padronização dos experimentos de desoxigenação da oxi-Hb.	60
Figura 22 - Janela de configuração do modo de aquisição de dados.	61
Figura 23 - Visualização interna do equipamento SFM 4000/S com seus respectivos misturadores (M1, M2 e M3).	63
Figura 24 - Redução da meta-Hb a oxi-Hb após a passagem pela coluna de gel Sephadex G-25.	67
Figura 25 - Curva de calibração da forma oxigenada da hemoglobina no comprimento de onda de 415 nm (banda de Soret).	69

Figura 26 - Curva de calibração da desoxi-Hb no comprimento e onda de 415 nm (banda de Soret).....	70
Figura 27 - Gráfico de absorbância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 10 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).	71
Figura 28 - Gráfico de absorbância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 20 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).	71
Figura 29 - Gráfico de absorbância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 30 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).	72
Figura 30 - Gráfico de absorbância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 40 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).	72
Figura 31 - Gráfico de absorbância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 50 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).	73
Figura 32 - Gráfico de absorbância de todas as concentrações de hemoglobina utilizadas no equipamento SFM 4000/S no comprimento de onda de 415 nm. ..	73
Figura 33 - Espectro da varredura da oxi-Hb antes da mistura (linha contínua) e após a mistura (linha pontilhada) no SFM 4000/S, demonstrando a formação da desoxi-Hb com seus picos específicos (430 e 555 nm) em comparação com a literatura (gráfico menor).....	74
Figura 34 - valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.	75
Figura 35 - Gráfico da concentração de 20 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.	76
Figura 36 - Gráfico da concentração de 30 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.	76
Figura 37 - Gráfico da concentração de 40 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.	77
Figura 38 - Gráfico da concentração de 50 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.	77
Figura 39 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 10 μM de Oxi-Hb.....	78
Figura 40 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 20 μM de Oxi-Hb.....	79
Figura 41 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 30 μM de Oxi-Hb.....	79
Figura 42 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 40 μM de Oxi-Hb.....	80

Figura 43 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 50 μM de Oxi-Hb.	80
Figura 44 – Gráfico representando a curva característica para a reação de desoxigenação da oxi-Hb utilizando o valor médio de k_{off} de 40,24 s^{-1}	81
Figura 45 – Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.	83
Figura 46 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.	83
Figura 47 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.	84
Figura 48 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.	84
Figura 49 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no e tempo de 0,1 s.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Desoxi-Hb	Desoxi-hemoglobina
DTS	Ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
Hb	Hemoglobina
HEPES	Solução tampão (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
k_{off}	Constante de dissociação Hb-ligante
Meta-Hb	Meta-Hemoglobina
Oxi-Hb	Oxi-Hemoglobina
SFM	<i>Stopped Flow Mixer</i> (Misturador de fluxo interrompido)
2,3 - DPG	2,3 - Difosfoglicerato
TM	Tempo Morto
<i>Stripped</i>	Hemoglobina pura sem 2,3 -DPG e outros interferentes.
Hp	Haptoglobina – proteína plasmática que se liga a hemoglobina levando a sua destruição.
CA	Anidrase Carbônica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo Geral.....	26
1.1.2 Objetivos Específicos	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 A HEMOGLOBINA.....	27
2.1.1 Estrutura tridimensional da hemoglobina	29
2.1.2 O grupo heme	30
2.1.3 Estados conformacionais da hemoglobina	32
2.1.4 Espectro de absorção das diferentes formas de hemoglobina	34
2.2 A REAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO	36
2.2.1 Fatores que interferem na reação da hemoglobina com o oxigênio....	38
2.2.2 Experimentos para estudo da reação do oxigênio com a hemoglobina	41
2.3 O MÉTODO DE MISTURA RÁPIDA	43
2.3.1 Método de mistura rápida com fluxo contínuo	43
2.3.2 Método de mistura rápida com fluxo interrompido (Stopped flow) ...	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 MATERIAIS	49
3.2 MÉTODOS	51
3.2.1 Obtenção da Oxi-Hemoglobina Pura (stripped)	51
3.2.2 O método de fluxo interrompido do equipamento SFM 4000/S.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 REDUÇÃO DA META-HEMOGLOBINA	67
4.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO	68
4.4 GRÁFICOS DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	70
4.5 DESOXIGENAÇÃO COMPLETA DA OXI-HEMOGLOBINA	74
4.6 GRÁFICOS DE CONCENTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO	75
4.7 CÁLCULOS DE Koff	78

5 CONCLUSÃO.....	87
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE A – Protocolo Experimental	99

1 INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína de estrutura quaternária com tamanho de 64.500 Da (daltons) que está presente no interior dos eritrócitos. Possui extrema importância na manutenção das trocas gasosas que ocorrem nos capilares sanguíneos dos alvéolos pulmonares devido a sua capacidade de transporte de oxigênio e gás carbônico. O conhecimento da cinética da reação da hemoglobina com o oxigênio vem despertando interesse pela comunidade científica para o desenvolvimento de pesquisas a nível de oxigenação cerebral, pois o oxigênio é de extrema necessidade para a sobrevivência celular. Portanto, sua privação ao organismo pode originar diversas patologias (hemoglobinopatias, cardiopatias, acidentes vasculares cerebrais, dentre outras) (BLAU; STAMATOYANNOPOULOS, 1994; BUNN; FORGET, 1986; HIGGS; ENEGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012).

A hemoglobina é capaz de fornecer aproximadamente 97% de oxigênio para todo o organismo, sendo considerada uma transportadora celular de gases extremamente desenvolvida, favorecendo a captação do oxigênio nos capilares pulmonares até a sua liberação nos capilares teciduais, pois essa molécula realiza um importante tamponamento sanguíneo, removendo os íons (H^+) e contribuindo, desse modo, para a manutenção do pH sanguíneo (ARNONE, 1974; WALTEMATH, 1970).

Essa molécula apresenta três principais estados conformacionais: oxi-hemoglobina (oxi-Hb), desoxi-hemoglobina (desoxi-Hb) e meta-hemoglobina (meta-Hb). O oxigênio liga-se de forma reversível ao grupo heme de forma que cada molécula de hemoglobina pode transportar quatro moléculas de oxigênio (O_2). A reação da hemoglobina com o oxigênio ocorre de forma cooperativa, pois a ligação da primeira molécula de oxigênio ao grupo heme aumenta a afinidade pelo O_2 aos demais grupos heme. Essa reação ocorre de forma muito rápida (milissegundos) através de quatro etapas reversíveis, sendo sua dinâmica pouco conhecida e por esse motivo necessita de equipamentos capazes de obter os dados de absorbância logo após o início da reação.

Com o intuito de atingir esse objetivo, faz-se necessário a utilização de um equipamento apropriado para esse tipo de abordagem. O equipamento Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM – 4000/S), localizado no departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, é um dos mais rápidos do mercado. A eficiência do método de mistura rápida está no tempo de mistura e no início da aquisição de dados. Esse tempo, chamado tempo morto (TM), é fator determinante na utilização dessa técnica e o SFM 4000/S apresenta um TM que pode

chegar até 0,2 ms, que é bem superior à média de outros fabricantes (2 ms) (BATISTELA et al., 2006; BIOLOGIC SCIENCE INSTRUMENTS, 2014).

Trabalhos presentes na literatura tentaram aproximar essa reação através de um modelo de pseudo-primeira ordem e os dados presentes nos mesmos são insuficientes para o desenvolvimento de um modelo que possa calcular as constantes cinéticas individualmente. Por esse motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de um protocolo experimental bem detalhado, que seja de fácil reprodução para ser usado em trabalhos futuros, com o objetivo de calcular as constantes cinéticas através da proposta de um novo modelo matemático.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho é composto dos seguintes objetivos propostos abaixo:

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo experimental para a reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina pelo método de fluxo interrompido no equipamento *Stopped Flow Mixer 4000/S**.

1.1.2 Objetivos Específicos

- reduzir a meta-hemoglobina a oxi-hemoglobina;
- realizar a desoxigenação da oxi-hemoglobina utilizando a técnica de fluxo interrompido.
- analisar a possibilidade da utilização do modelo de pseudo-primeira ordem para descrição da dinâmica da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina.

* O procedimento experimental da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina foi desenvolvido em conjunto com a doutoranda Adriana Teixeira do Laboratório de Neuroengenharia Computacional da Universidade Federal de Santa Catarina.

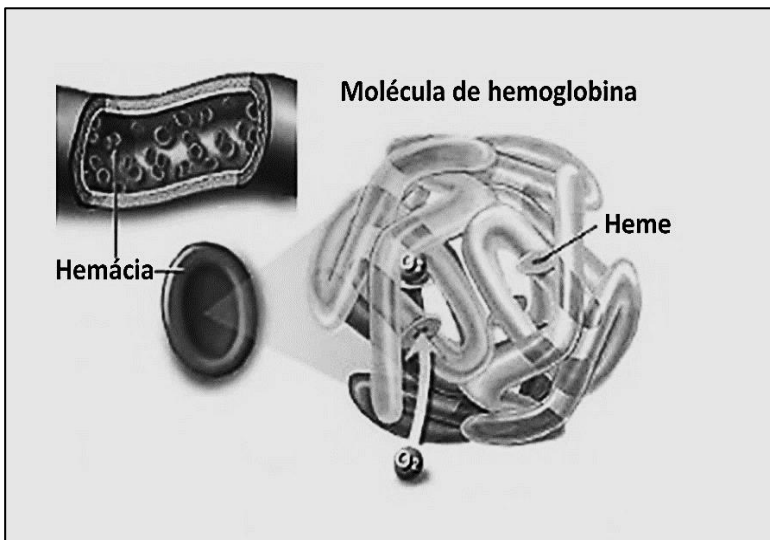
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A HEMOGLOBINA

A hemoglobina é um dos exemplos de maior relevância do processo evolutivo e da eficiência dos sistemas biológicos, pois além de ser responsável pelas trocas gasosas, atua também como um importante sistema de tamponamento do organismo, removendo os íons (H^+) e mantendo, desse modo, o pH constante. Sua principal função é a hematose, ou seja, as trocas gasosas. O íon metálico Fe^{2+} presente no grupo prostético heme pode ligar-se reversivelmente ao átomo oxigênio e transportá-lo dos pulmões para os tecidos periféricos ou ligar-se ao dióxido de carbono e conduzi-lo dos tecidos para os pulmões (ARNONE, 1974; PERUTZ, 1979, 1980).

A hemoglobina (Hb) está presente no interior dos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), conforme pode ser observado na Figura 1, que são as células sanguíneas mais abundantes. Em adultos, a concentração desse tipo celular fica em torno de 5 milhões por cm^3 .

Figura 1 - Localização da hemoglobina no sistema sanguíneo.



Fonte: Guyton e Hall (2006).

Nos mamíferos, os eritrócitos possuem forma côncava e tornam-se anucleados durante o processo de maturação celular. Os eritrócitos são produzidos na medula óssea e cada célula vive um período de cerca de 120 dias na corrente sanguínea para depois ser removida e destruída. Os eritrócitos senescentes se degradam logo após quatro meses na medula óssea, fígado e baço. Em algumas ocasiões sofrem lise intravascular, liberando hemoglobina, que pode ser tóxica aos tecidos e, portanto, deve ser removida instantaneamente. Quando esse fenômeno ocorre, a hemoglobina, agora denominada hemoglobina livre, se une à proteína plasmática haptoglobina (Hp), formando o complexo Hp-Hb. Outra proteína denominada CD163, presente na superfície dos monócitos e macrófagos, reconhece esse complexo dando início a destruição do mesmo, liberando, assim, ferro e bilirrubina (JIA et al., 2013).

Em condições fisiológicas, cerca de 97% do oxigênio no sangue que é transportado dos pulmões para os tecidos estão quimicamente combinados com a hemoglobina presente nos eritrócitos na forma oxigenada (HbO₂). Os 3% restantes estão livremente fora da hemácia, dissolvidos na água do plasma e das células. Uma pessoa adulta possui aproximadamente 15 g de hemoglobina para cada 100 ml de sangue, podendo combinar-se a um total de quase 20 ml de oxigênio quando a saturação da hemoglobina é de 100% (BUCCI, 2009).

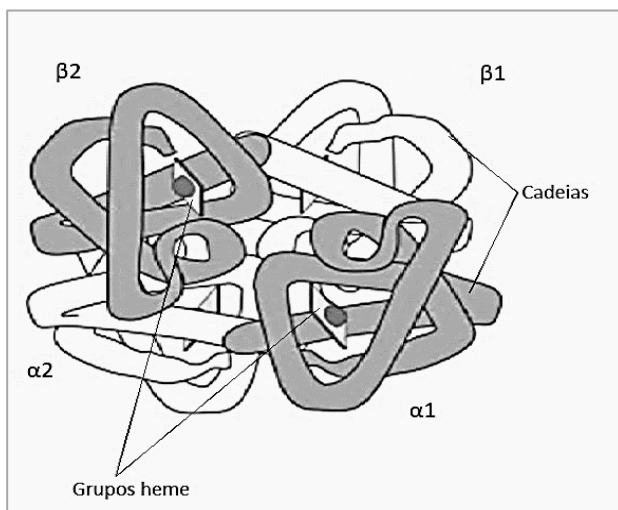
O transporte de oxigênio e gás carbônico é realizado por aproximadamente 270 milhões de moléculas de hemoglobina presentes em cada eritrócito. A concentração da hemoglobina presente no sangue é de aproximadamente 13,5 a 18,0 g/dL nos homens e 11,5 a 16,0 g/dL nas mulheres (THOMAS; LUMB, 2012; WALTEMATH, 1970).

A molécula de Hb tem um papel importante na história da química, biologia e medicina por ser a primeira proteína a ser cristalizada em 1849 e associada a uma função fisiológica específica. Também foi a primeira a ter sua estrutura descoberta através do estudo de sangue de cavalo, no qual a oxi-Hb foi cristalizada e analisada com o uso de difração de raios X por cristalografia de proteínas (PEÑUELA, 2005; PERUTZ *et al.*, 1960).

2.1.1 Estrutura tridimensional da hemoglobina

A Hb é uma proteína de estrutura quaternária com peso molecular de aproximadamente 64.500 Da. Essa proteína situa-se no interior dos eritrócitos e é formada por quatro cadeias polipeptídicas. Mais de 95% da hemoglobina adulta está na forma de HbA, composta por quatro globinas, sendo duas alfas (141 aminoácidos, sendo a valina o N-terminal e a arginina o C-terminal) e duas betas (146 aminoácidos, sendo a valina o N-terminal e a histidina o C-terminal). Aproximadamente 2,2% a 3,5% da hemoglobina humana é formada por HbA₂, que é também constituída por quatro cadeias (duas α e duas δ), sendo que essa forma é muito ineficiente no transporte do oxigênio. Cada uma dessas quatro subunidades está combinada com um grupo prostético denominado “heme”, constituído por uma parte orgânica chamada de protoporfirina e um átomo de ferro (Figura 2). O grupo heme possui um íon ferroso (Fe^{2+}) localizado centralmente que é capaz de ligar-se ao oxigênio de forma reversível (PERUTZ et al., 1960; ARNONE, 1974; PARSONS et al., 1996).

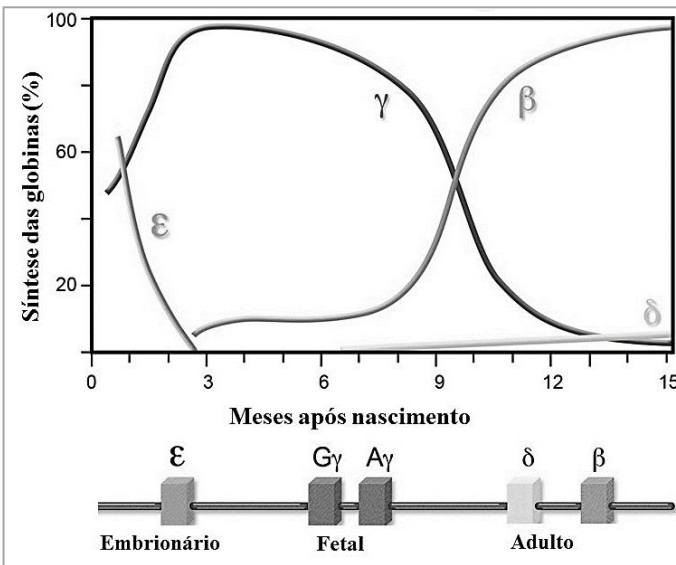
Figura 2 - Representação da estrutura tridimensional da molécula de hemoglobina com suas quatro cadeias (duas α e duas β).



Fonte: Adaptado de Eaton (2007).

No desenvolvimento fetal, a captação de oxigênio a partir do sangue materno é realizada por meio do desenvolvimento da hemoglobina fetal (HbF) (Figura 3). Duas das quatro cadeias da hemoglobina fetal e do adulto (cadeias alfa - α) são idênticas, mas a hemoglobina adulta tem duas cadeias β (beta), enquanto que o feto tem duas cadeias gama (γ). As cadeias β ligam-se ao 2,3 - bífosfoglicerato, que participa na liberação do oxigênio. As cadeias γ não se ligam igualmente ao 2,3 - bífosfoglicerato e por esse motivo possuem uma maior afinidade para com o oxigênio. Em um ambiente restrito em oxigênio, como o da placenta, o oxigênio é liberado da hemoglobina materna sendo captado pela hemoglobina fetal. A hemoglobina fetal não é prejudicial na infância, e nos humanos, a substituição da hemoglobina fetal pela hemoglobina adulta se completa geralmente após 6 meses de vida (BAUER; KAMRAN; ORKIN, 2012).

Figura 3 - Síntese das globinas após o nascimento do indivíduo.



Fonte: Adaptado de Bauer; Kamran e Orkin, 2012.

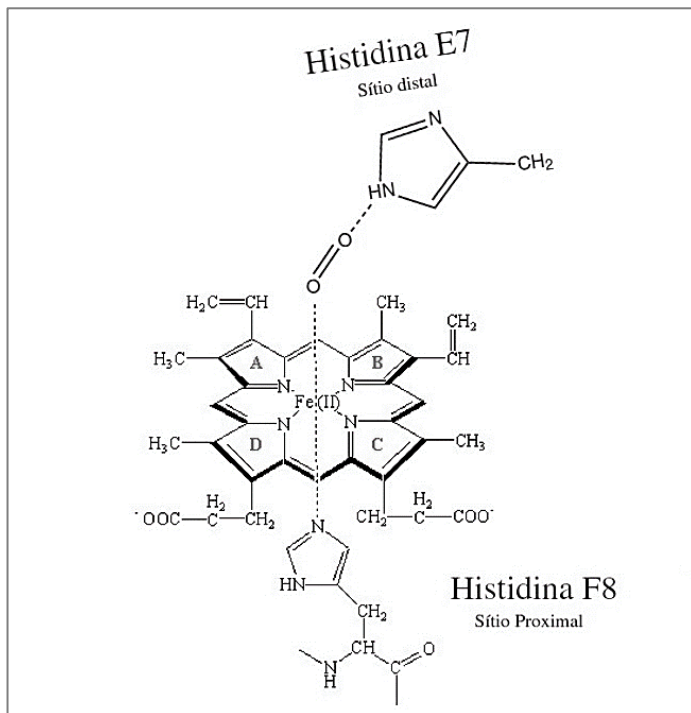
2.1.2 O grupo heme

O grupo heme é formado por um íon de ferro presente no centro de um anel orgânico, denominado de protoporfirina IV. As

protoporfirinas são compostos cíclicos formados pela ligação de quatro anéis pirrólicos (A, B, C, D) unidos por pontes metenil (-CH=). Essa estrutura é conhecida como participante da constituição da hemoglobina, sendo também responsável pela cor vermelha característica das hemácias do sistema sanguíneo. Uma das características das porfirinas é a formação de complexos com íons metálicos que se unem ao hidrogênio dos anéis pirrólicos, formando compostos de extrema importância biológica, como a hemoglobina. Cada grupo heme se liga a uma molécula de O₂ de forma não covalente. O átomo de ferro encontra-se geralmente no estado ferroso (Fe²⁺), independentemente se o grupo heme se apresenta oxigenado ou não. O Fe²⁺ realiza seis ligações: quatro com átomos de nitrogênio no centro do anel de protoporfirina, uma com a histidina proximal e a última ligação é feita com a molécula de oxigênio, formando uma estrutura piramidal quadrática (Figura 4). Próximo ao sítio de ligação do oxigênio encontra-se outro resíduo de histidina, chamada de distal, que tem papel importante na prevenção de oxidação do átomo de ferro para a forma férrica (Fe³⁺) e também evita que o dióxido de carbono se ligue irreversivelmente a hemoglobina. Tal aspecto é importante pois a histidina distal, inviabiliza a disposição linear do ligante CO ao plano porfirínico. De qualquer forma, essa restrição não altera a afinidade da ligação com o oxigênio. Essa característica aliada a ligação do hidrogênio extremamente efetiva que acontece entre o oxigênio e a histidina distal, favorece significativamente esta ligação ao íon ferroso, tomando possível o transporte de oxigênio nos seres vivos (MOREIRA *et al.*, 2011).

O grupo heme é sintetizado praticamente em todos os tecidos, mas sua produção mais expressiva é na medula óssea e fígado, devido a necessidade de ser incorporado a molécula de hemoglobina, tendo importância fundamental na regulação da taxa de síntese de globina. Esse complexo exerce um efeito na iniciação da tradução, onde bloqueia um inibidor da produção de globina. Também participa da transcrição e processamento do RNAm (RNA mensageiro), se estendendo para fora do eritrócito e participando da síntese proteica. A nível espectrofotométrico, apresenta um pico na região de Soret (400-440 nm) e outros picos na banda Q (500-650 nm) (ANDRADE *et al.*, 2003; SCHECHTER, 2008).

Figura 4 - Representação estrutural do grupo heme composto por uma porfirina ligada a um átomo de ferro, com destaque para as histidinas proximal e distal. A histidina distal é onde se coordena o oxigênio molecular.



Fonte: Adaptado de PEÑUELA (2005).

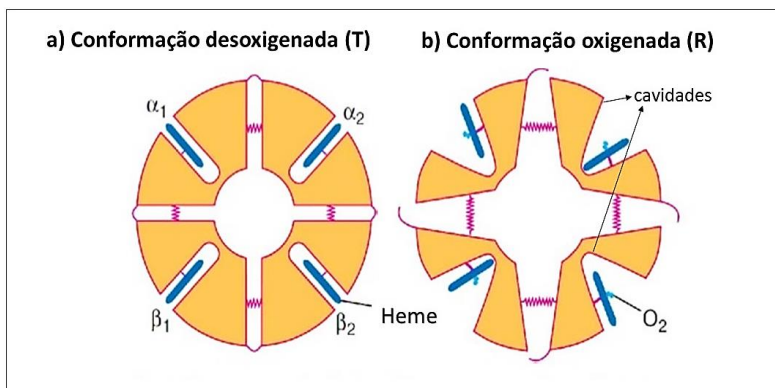
2.1.3 Estados conformacionais da hemoglobina

A hemoglobina possui três principais estados conformacionais: oxi-Hb (oxi-hemoglobina), desoxi-hemoglobina (desoxi-Hb) e meta-hemoglobina (meta-Hb). O O₂ liga-se reversivelmente ao grupo heme de forma que cada molécula de hemoglobina transporta quatro moléculas de oxigênio. Essa proteína é considerada alostérica devido a ligação da primeira molécula de oxigênio ao grupo heme aumentar a afinidade pelo O₂ com os demais grupos heme. Esse fenômeno, denominado cooperatividade, implica que a forma oxigenada (oxi-Hb) é distinta estruturalmente da desoxi-Hb (forma desoxigenada). Assim que uma molécula de oxigênio se liga ao grupo heme, ela aproxima ainda mais o

ferro em direção ao anel de protoporfirina provocando uma mudança na sua conformação. Esse pequeno movimento provoca uma interação iônica mantendo as quatro globinas juntas, alterando a estrutura quaternária, provocando um aumento na afinidade pelo oxigênio.

O grupo heme localiza-se numa cavidade ao lado de cada globina. A abertura dessa passagem determina a capacidade do oxigênio de se ligar ou não a hemoglobina. Na forma desoxigenada, a estrutura quaternária é descrita como estado tenso (T), pois o caminho por onde passa o oxigênio é menor, dificultando o acesso da molécula ao grupo heme. Quando ocorre a ligação da primeira molécula de oxigênio O_2 , a estrutura é alterada, provocando um relaxamento que facilita a ligação das demais moléculas gasosas ao grupo heme fazendo com que a hemoglobina se oxigene totalmente mudando sua forma quaternária para o estado relaxado (R) (PARKHURST,1979; BROWN; SOON, 2013; PERUTZ, 1990). Um esquema ilustrando a transição entre as duas formas pode ser observado na Figura 5:

Figura 5 – Representação das formas oxi e desoxi-Hb. a) a conformação desoxigenada (estado T) diminui a afinidade pelo oxigênio. b) o relaxamento provocado pela ligação da primeira molécula de O_2 faz com que a afinidade pelo oxigênio aumente pelo movimento das globinas permitindo a total oxigenação da hemoglobina.

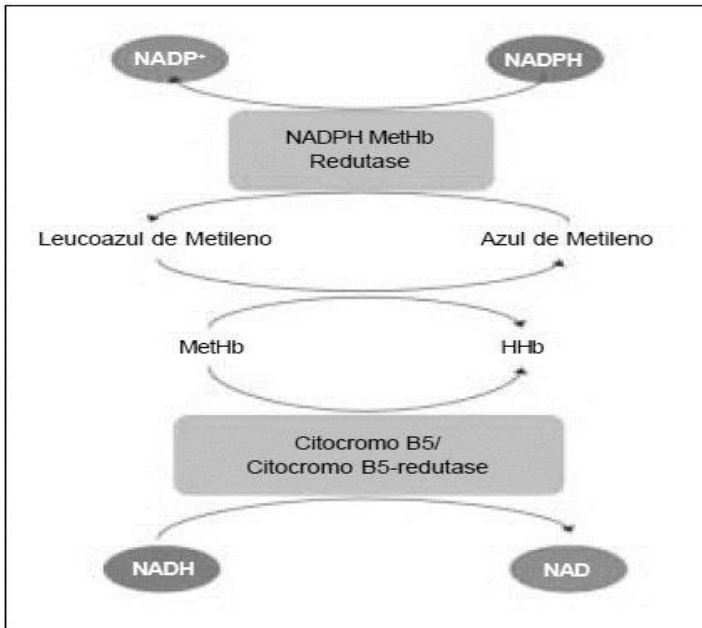


Fonte: GEVORKIAN *et al.* (2015).

A forma meta-Hb corresponde à forma oxidada da hemoglobina, na qual o átomo de ferro do grupo heme encontra-se no estado férrico, sem a capacidade de se ligar ao oxigênio. O ferro oxidado age provocando

uma alteração alostérica no grupo heme da Hb, dificultando a liberação de oxigênio para os tecidos. Alterações congênitas e exposição a agentes químicos provocam aumento da concentração de meta-Hb no sangue. Porém, o organismo possui sistemas redutores naturais mantendo os níveis de meta-Hb abaixo de 2%. A NADH metemoglobina redutase (NADHMR), que é constituída de um conjunto de duas enzimas, o citocromoB5 e o citocromo B5-redutase (CB5R), corresponde a 99% da redução da meta-Hb (Figura 6), transferindo um elétron do NADH para a meta-Hb, convertendo-a em hemoglobina reduzida (BOUZIRI et al., 2010; CHUI et al., 2005; GEBICKA; BANASIAK, 2009; RODRIGUES; VIERA; RODRIGUES, 2011).

Figura 6 - Principal via de redução da meta-Hb no organismo.



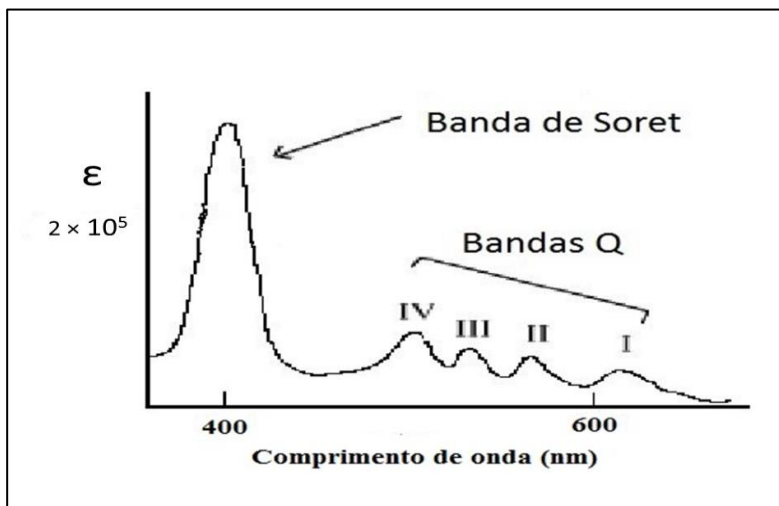
Fonte: Nascimento et al. (2008).

2.1.4 Espectro de absorção das diferentes formas de hemoglobina

As proteínas constituídas de um átomo de ferro (metaloproteínas), como a Hb, possuem geralmente um valor de

absorbância máxima na região denominada banda de Soret, na faixa de 400 a 440 nm, e outras de menor intensidade na região denominada banda Q, que fica entre 500 e 630 nm (Figura 7).

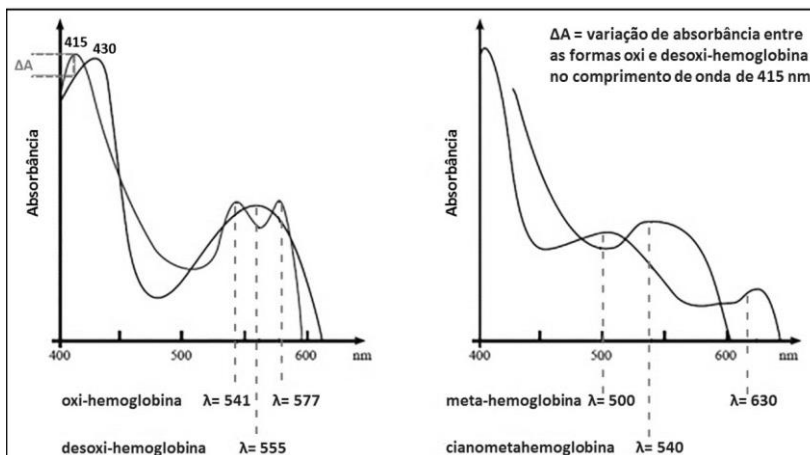
Figura 7 - Espectro típico de absorbância de uma metaloproteína representado pelo pico de máxima intensidade (Soret) e pelas bandas Q correspondente aos picos de menor intensidade.



Fonte: Adaptado de Pye et al. (2013).

As formas de Hb são diferenciadas pelos picos de absorvância bem característicos de cada estado conformacional. A meta-Hb apresenta pico máximo em 405 nm e picos menores em 500 e 630 nm. A oxi-Hb tem pico máximo em 415 nm e picos menores na banda Q em 541 e 577 nm. A forma desoxigenada possui pico máximo de absorvância em 430 nm e pico menor em 555 nm (NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004; TOSQUI; COLOMBO, 2011). Os espectros de absorvância das três formas da hemoglobina podem ser observados na Figura 8:

Figura 8 - Espectro de absorção das diferentes formas de hemoglobina. A oxi-Hb apresenta um pico máximo de absorbância na região de Soret em 415 nm, porém, a desoxi-Hb possui também um valor significativo de absorbância nesse mesmo comprimento de onda.



Fonte: Adaptado de Barata et al. (2015).

2.2 A REAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO

A hemoglobina é a proteína mais estudada desde o último século, possuindo um papel histórico importante nas mais diferentes áreas. Tal fato incentivou o pioneirismo de pesquisadores na época a tentar desvendar a relação dessa proteína com o oxigênio.

Bohr *et al.* (1904) determinaram que a curva de dissociação da hemoglobina com o oxigênio tinha comportamento sigmoide, sugerindo, pela primeira vez, que a ligação era do tipo cooperativa, ou seja, assim que o número de moléculas de oxigênio ligadas a hemoglobina aumenta, a afinidade pelo oxigênio também aumenta (Figura 9). As quatro subunidades da proteína comunicam-se entre si, agindo de uma forma dependente uma da outra. Quando um grupo heme liga-se a primeira molécula de oxigênio, processo esse que ocorre mais lentamente, ocorre um estímulo para as outras três moléculas interagirem com o oxigênio mais rapidamente até atingirem a completa saturação (CLERBAUX *et al.*, 2006; PAULING, 1935).

Hill (1910) foi o primeiro a descrever a reação da hemoglobina com o oxigênio, afirmando que a hemoglobina era composta por

moléculas contendo cada uma um átomo de ferro, mas desconhecia a quantidade exata desses sítios reativos. Ele então sugeriu a equação (1) para tentar explicar a forma sigmoideal da curva, supondo que a hemoglobina se ligaria a “n” mols de O₂ e que estas ligações ocorreriam simultaneamente e não de forma sequencial.

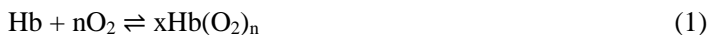
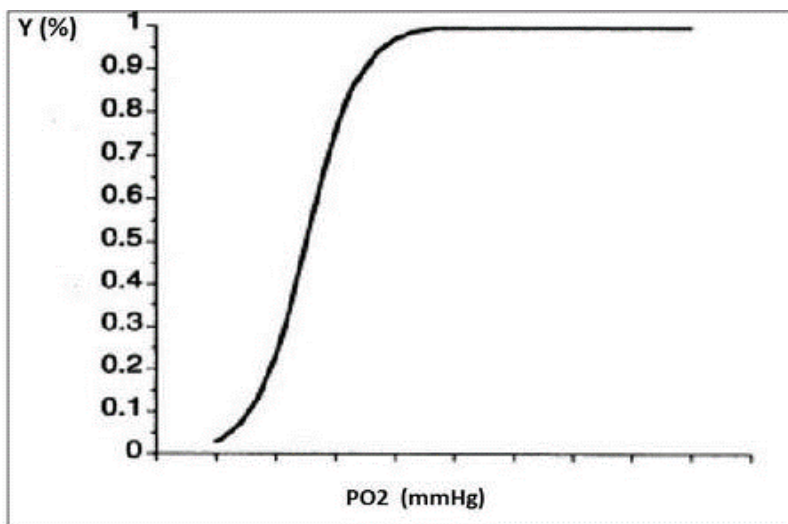


Figura 9 - Relação da porcentagem de saturação de hemoglobina (Y) com a pressão de oxigênio (P_{O₂}), representando uma curva de forma sigmoideal.



Fonte: Adaptado de Klotz (2003).

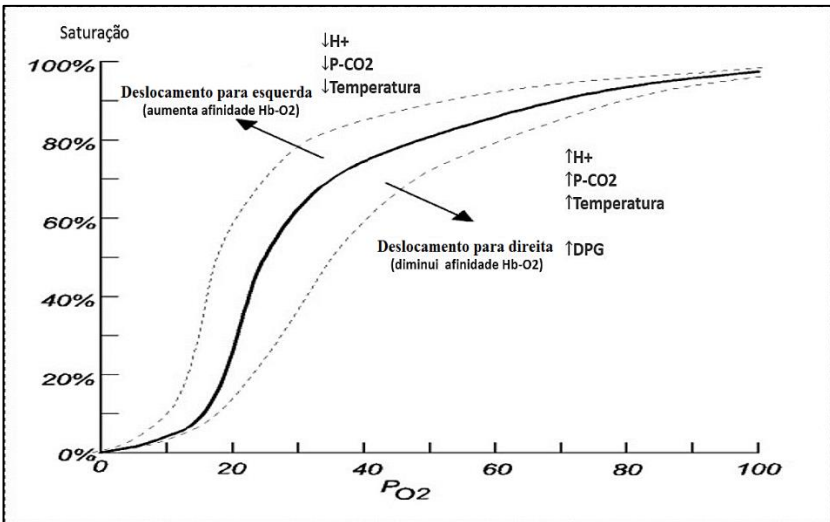
Adair (1925), através de experimentos usando pressão osmótica, descobriu a existência de mais de uma molécula de ferro presente na hemoglobina. Ele constatou que quatro grupos heme reagem sequencialmente com quatro moléculas de oxigênio produzindo uma série de compostos intermediários de oxigênio (Hb, HbO₂, HbO₄, HbO₆, HbO₈), sendo essas reações da hemoglobina com o oxigênio reversíveis e cada uma com sua constante de equilíbrio, conforme representado pela Equações (2) a (5):



2.2.1 Fatores que interferem na reação da hemoglobina com o oxigênio.

A afinidade da Hb pelo oxigênio também é modulada por interferências de alguns fatores, os quais podem deslocar a curva de dissociação para a direita, diminuindo a afinidade pelo O_2 , ou para a esquerda, provocando um aumento na afinidade pelo O_2 (Figura 10).

Figura 10 – Gráfico de saturação da hemoglobina em função da pressão parcial de oxigênio demonstrando as mudanças na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio provocada pelos interferente.



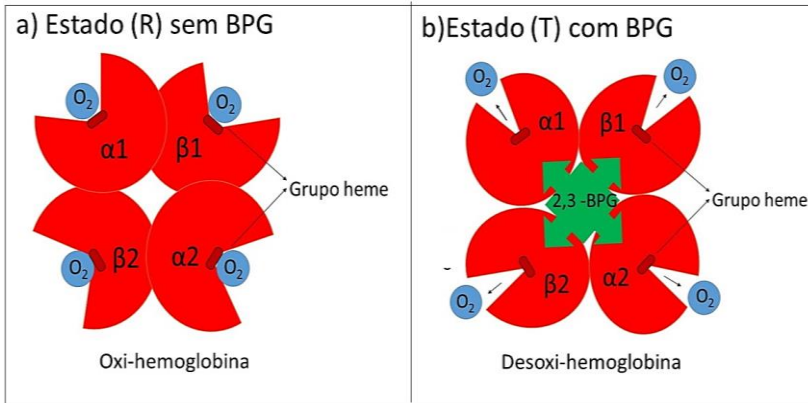
Fonte: Adaptado de THOMAS e LUMB (2012).

2.2.1.1 O 2,3-bifosfoglicerato

O 2,3-BPG está presente nas hemácias e é altamente sensível a várias condições fisiológicas e patológicas. Esse fosfato orgânico é sintetizado a partir de 1,3-bisfosfoglicerato, um intermediário da glicólise. Uma vez que o 2,3-BPG e outros ânions se ligam preferencialmente a hemoglobina e se fixam na sua cavidade central, estabilizam o estado T, (desoxi-Hb, baixa afinidade) fazendo com que a afinidade pelo oxigênio diminua (Figura 11). O decréscimo da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio facilita a liberação desse gás para os tecidos. Além de outros fosfatos também influenciarem a afinidade pelo oxigênio, nenhum deles tem um efeito tão significativo quanto o 2,3 - BPG. Os níveis de bifosfoglicerato aumentam de forma considerável quando os tecidos sofrem privação crônica de oxigênio, como ocorre em algumas condições patológicas: hipóxia, anemia, insuficiência cardíaca e adaptação a elevadas altitudes. Portanto, a principal função do 2,3-BPG é reduzir a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, combinando-se e estabilizando a forma desoxigenada da hemoglobina, impedindo que o oxigênio liberado para os tecidos seja recaptado pelo eritrócito. Quando a primeira molécula de oxigênio se liga a hemoglobina, o bifosfoglicerato é eliminado através do rompimento das pontes salinas que foram formadas na forma tensa da hemoglobina (SAMAJA; WINSLOW, 1979).

As variações na concentração de 2,3-BPG desempenham um papel importante na adaptação de situações de hipóxia, sendo que essa condição de diminuição de oxigênio provoca um aumento na quantidade desse fosfato a nível eritrocitário, fazendo com que a afinidade pelo oxigênio diminua, facilitando a liberação de O₂ para os tecidos. O aumento da produção de 2,3- BPG permite, em poucas horas, a adaptação em altitudes acima de 2.000 m do nível do mar, onde o ar é mais rarefeito. Nas anemias, o seu aumento é um dos mecanismos adaptativos mais importantes (BENESCH; BENESCH; YU, 1968; GRAY, 1974; KLOCKE, 1972; MILLER; BAEHNER, 1995; MULQUINEY; KUCHEL, 1999; STORZ; MORIYAMA, 2008).

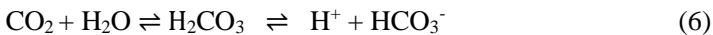
Figura 11 - Ligação da molécula de 2,3 - DPG a hemoglobina: a) forma oxigenada da hemoglobina sem a presença do fosfato orgânico; b) ligação do bifosfoglicerato ao centro da hemoglobina pressionando o grupo heme de cada cadeia a liberar a molécula de oxigênio com objetivo de impedir a sua receptação.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

2.2.1.2 Alterações do pH

O aumento da acidez do plasma provoca uma queda na afinidade da Hb por oxigênio. A reação entre o CO₂ e a H₂O, representada na Equação 6, é rapidamente catalisada pela enzima anidrase carbônica (CA) dentro do eritrócito. O ácido carbônico (H₂CO₃) resultante dessa reação se dissocia em hidrogênio (H⁺) e bicarbonato (HCO₃⁻). A maior parte do CO₂ não se apresenta dissolvida no sangue, mas combinada com água formando bicarbonato.



A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio também é influenciada pelo pH devido às ligações entre O₂, íons H⁺ e CO₂, fazendo com que a curva de dissociação do oxigênio-hemoglobina seja desviada para esquerda ou para direita. Esse mecanismo, denominado efeito Bohr, possui um efeito muito importante, pois promove o carregamento de oxigênio nos pulmões e liberação nos tecidos para manter o pH plasmático. Tal fenômeno é ocasionado pelas variações do dióxido de carbono e dos íons hidrogênio sanguíneos, que aumentam a oxigenação sanguínea nos pulmões, bem como a liberação de O₂ das hemácias aos

tecidos. Esse fenômeno pode ser explicado segundo o princípio de Le Chatelier aplicado à reação apresentada na Equação 7:



Quando o equilíbrio se desloca para a esquerda (nos pulmões), o CO_2 difunde-se do sangue para os alvéolos pulmonares reduzindo o H_2CO_3 no sangue e a oxigenação dos tecidos leva à liberação de íons hidrogênio, diminuindo sua concentração. Essa curva de dissociação do O_2 com a Hb pode ser explicada pela redução da P_{CO_2} e o aumento de P_{O_2} (oxi-Hb - caráter ácido da Hb alta afinidade O_2). No efeito oposto (curva desviada para a direita), a reação está ocorrendo nos capilares e os íons H^+ estão promovendo a liberação do O_2 para os tecidos. À medida que a P_{O_2} abaixa (desoxi-Hb - caráter básico da Hb, baixa afinidade O_2), a concentração de CO_2 e H^+ aumenta (CAMPBELL *et al.*, 1920; CLERBAUX *et al.*, 1986; GEERS; GROS, 2000; NIKINMAA, 1997).

2.2.2.3 Temperatura

A ligação da hemoglobina com o oxigênio é exotérmica. O aumento da temperatura corporal, como no caso de uma febre, altera o equilíbrio da reação, movimentando a curva para a direita e fazendo com que ocorra uma diminuição na afinidade pelo oxigênio. Já em casos de hipotermia, onde há diminuição acentuada da temperatura corporal, a curva é movida para a esquerda, promovendo uma maior afinidade pelo oxigênio (REEVES, 1980; ANDERSEN *et al.*, 1984).

2.2.2 Experimentos para estudo da reação do oxigênio com a hemoglobina

Apesar dos primeiros trabalhos datarem do século passado, poucos estudos têm sido realizados com relação à análise da cinética da reação da hemoglobina com o oxigênio. Um dos principais motivos para essa defasagem é a alta velocidade com que essa reação ocorre (KHORASSANI *et al.*, 2011).

A hemoglobina foi a proteína chave nos estudos de cinéticas rápidas, exigindo o desenvolvimento de novas técnicas para seu estudo cinético. No entanto, poucos trabalhos foram realizados com a ligação da hemoglobina ao oxigênio. Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando o monóxido de carbono (CO), que se liga a

hemoglobina em uma velocidade muito inferior à do oxigênio, sendo muito mais fácil de ser monitorada.

Segundo Gibson (1959), as dificuldades encontradas no estudo cinético da hemoglobina com o oxigênio eram devido ao fato de as constantes de velocidade de dissociação (k_{off}) e ligação (k_{on}) do oxigênio serem muito altas, necessitando de equipamentos de mistura rápida com um tempo morto inferior a 1 ms. Outros problemas referentes a técnica de mistura rápida foram relatados, tais como o aumento brusco de velocidade, ocorrência de cavitação e viscosidade da mistura.

O desenvolvimento de equipamentos de mistura rápida mais eficazes, aliado ao estudo hidrodinâmico dos fluidos e a evolução dos métodos espectrofotométricos promete solucionar as limitações encontradas na época e traz de volta o método de mistura rápida de fluxo interrompido como importante aliado no estudo de reações de grande complexidade. Além disso, essa técnica é a mais utilizada devido à facilidade de se trabalhar praticamente com qualquer tipo de reação e também pelo fato de se utilizar uma quantidade muito pequena de amostra, na ordem de microlitros (FRESKGDARD; BERGENHEM; CARLSSON, 1992).

2.2.2.1 A desoxigenação da hemoglobina com o uso de ditionito de sódio

A desoxigenação da oxi-Hb pelo uso de ditionito de sódio (DTS) em excesso vem sendo usado desde os primeiros trabalhos realizados pelo método de mistura rápida por Hartridge e Roughton (1923). O DTS é o reagente mais comum empregado na desoxigenação dos pigmentos heme e vem sendo amplamente utilizado nos mais variados processos bioquímicos.

O motivo pelo uso frequente desse sal é devido a capacidade dele remover completamente o oxigênio de heme proteínas e também ao fato de poder ser admitido que os produtos gerados não produzem artefatos durante a reação. Outro fator importante é que ele aparentemente não afeta a estrutura da hemoglobina nativa (WIREKO; ABRAHAM, 1992).

O uso desse agente redutor é encontrado em trabalhos de redução de enzimas, estudos de transferência de elétrons de proteínas e na reação cinética de dissociação da oxi-Hb (MCKENNA; GUTHEIL; SONG, 1991).

Apesar de ser bastante empregado nos mais variados tipos de experimentos, o mecanismo de redução do DTS é pouco conhecido e deve ser utilizado com cautela pelos pesquisadores. Embora esse composto não

interfira nos experimentos onde é usado para desoxigenar a oxi-Hb, é importante salientar que o mesmo em, grande excesso, pode afetar os resultados obtidos devido a variação de pH provocada pelo caráter ácido do mesmo (ABRAHAM *et al.*, 1984; COX; HOLLAWAY, 1977; LAMBETH; PALMER, 1973).

2.3 O MÉTODO DE MISTURA RÁPIDA

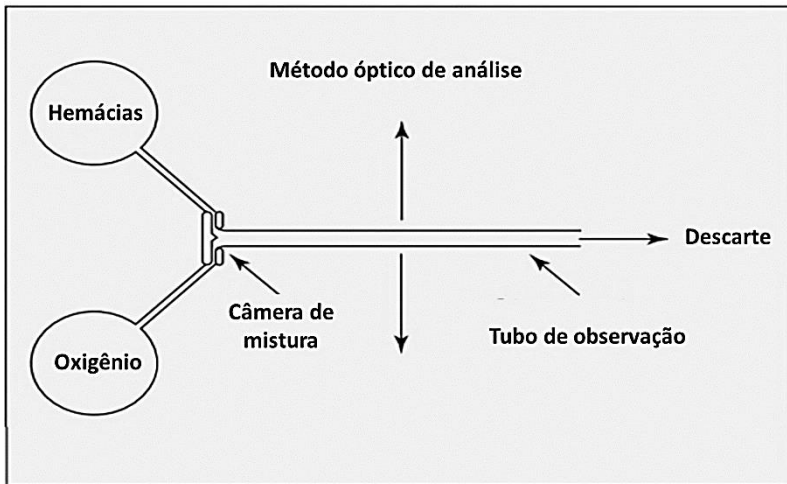
2.3.1 Método de mistura rápida com fluxo contínuo

O desenvolvimento de um método de mistura rápida de fluxo contínuo, capaz de mensurar a reação entre enzima e substrato, foi introduzido por Hartridge e Roughton (1923) para estudo da reação entre a hemoglobina e o oxigênio. O método, denominado de fluxo contínuo, também serviu como base para os experimentos de Adair (1925), que foi um dos pioneiros a desvendar os sítios de ligação da hemoglobina. Nessa técnica, os reagentes são armazenados em dois tubos e injetados de forma tangencial sob determinada pressão para um misturador dentro de uma câmara de mistura. Em seguida, a solução passa sob fluxo contínuo por um tubo de observação, onde se analisa o espectro de absorção em diferentes pontos ao longo do comprimento tubo. Como a velocidade do fluxo é constante, cada medida de distância corresponde a um intervalo de tempo após a mistura (Figura 12). Embora esse método funcionasse razoavelmente bem, ele possuía um tempo morto (período de tempo que a solução levava para ir do misturador até o ponto de observação) relativamente grande. Portanto, a observação dessas mudanças ocorridas no espectro da mistura durante os experimentos de fluxo contínuo necessitava de um período grande de tempo para ser avaliada, tornando tal técnica pouco viável para reações muito rápidas. Outro ponto negativo importante de ser destacado era a grande quantidade de reagentes utilizados por experimento.

Embora com limitações, essa técnica foi utilizada com sucesso por alguns pesquisadores. Millikan (1936) fez algumas modificações na técnica de mistura rápida a fim de viabilizar o transporte do equipamento, diminuindo o seu tamanho e tornando-o portátil, possibilitando o seu deslocamento para os mais diversos lugares. Esse aprimoramento facilitou sua pesquisa, a qual foi fundamentada empregando pigmentos heme de ovelhas nos seus experimentos. Chance (1940) aprimorou o método acelerando o fluxo com o uso de um sistema com multijatos de mistura. Tais alterações, aliadas a introdução do espectrofotômetro,

reduziram drasticamente o tempo morto para a ordem de milissegundos (KHORASSANI et al., 2015).

Figura 12 - Representação do método de mistura rápida de fluxo contínuo. O oxigênio e as hemácias são injetados sob uma vazão volumétrica constante em dois tubos ligados a um misturador conectado por um longo tubo capilar de observação. A análise óptica da mistura é realizada em determinados pontos ao longo do comprimento do tubo que são convertidos em intervalos de tempo.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

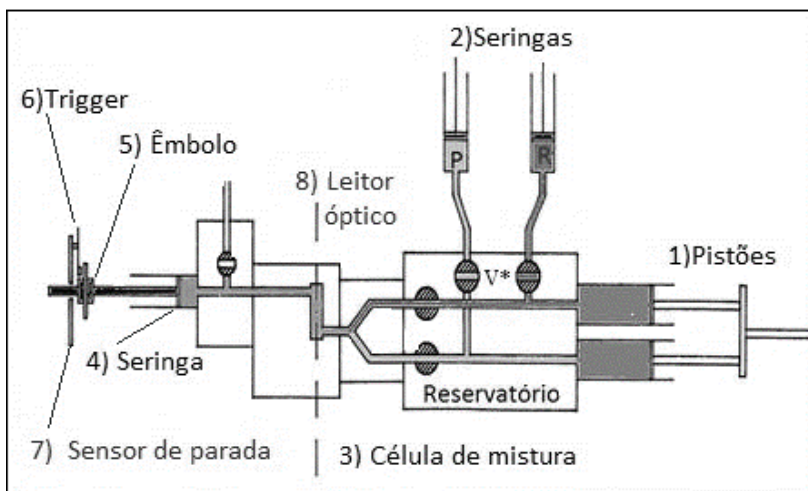
2.3.2 Método de mistura rápida com fluxo interrompido (Stopped flow)

O método de fluxo interrompido foi primeiramente proposto por Chance (1940) após várias modificações no método de fluxo contínuo, com o objetivo de economizar reagentes e possibilitar a leitura de reações cinéticas que acontecem de forma muito rápida. A quantidade de reagentes utilizada por esse processo foi reduzida a uma porção muito pequena, da ordem de mL, que foi obtida através da introdução da seringa de frenagem ou parada adicionado após a câmara de mistura do sistema. Tal inovação foi implementada por Gibson e Milnes (1964), que popularizam o método anteriormente restrito a grandes laboratórios.

Nessa técnica, as soluções são colocadas em reservatórios e injetadas rapidamente (milissegundos) em uma câmara de mistura, onde

começam a reagir. Logo após, a mistura é movida para uma célula espectrofotométrica e, finalmente, chegam à seringa de frenagem, interrompendo o fluxo. Essa seringa, ao ser preenchida com a solução, move seu êmbolo, ativando o botão *trigger* (gatilho), dando, assim, início imediato a aquisição dos dados de absorvância em função do tempo (Figura 13).

Figura 13 - Diagrama de funcionamento do método de mistura rápida com fluxo interrompido. Os pistões (1) movem os reagentes das seringas (2) para dentro dos reservatórios para serem misturados rapidamente na célula de mistura (3). Ao sair da célula de mistura, a solução move-se para uma seringa de frenagem (4), enchendo-a. O movimento do êmbolo (5) dessa seringa ativa o sensor de parada (7) acionando o *trigger* (6) que dá início a aquisição de dados de absorvância pelo leitor óptico (8).



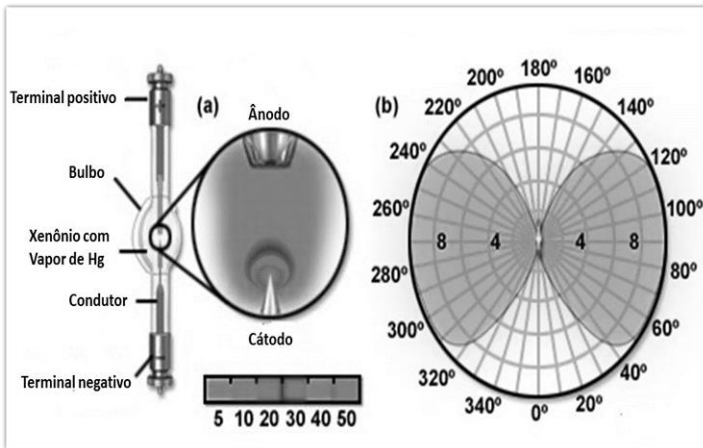
Fonte: Adaptado de Harvey e Borchardt (1972).

O método de fluxo interrompido necessita de uma série de componentes para o seu perfeito funcionamento:

- a) **Fonte de luz:** a fonte de luz geralmente é constituída por uma lâmpada Xe-Hg (xenônio acrescida de mercúrio). Esse tipo de lâmpada, chamada simplesmente de lâmpada de xenônio, é acionada por eletricidade do tipo descarga de alta intensidade, sendo denominada de HID (*High Intensity Discharge*). Esse

tipo de fonte de luz é composto por dois eletrodos confeccionados em um bulbo separados por uma mínima distância (milímetros), formando um pequeno arco voltaico que, apesar do tamanho reduzido, emite uma luz de alta intensidade (Figura 14). O bulbo é preenchido com gás xenônio (acrescido de Hg), tornando-se ionizado e atingindo alta pressão. São empregadas em diversas aplicações, sendo utilizadas amplamente em equipamentos espectrofotômetros. Possuem uma intensidade de luz muito próxima e similares à luz solar, sendo utilizados, inclusive, em aplicações medicinais (BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS, 2014; MANSUR et al., 2004; PARANHOS; LOPEZ-RICHARD; PIZANI, 2008).

Figura 14 - Lâmpada de xenônio acrescida de mercúrio (Hg): a) estrutura interna dos componentes da lâmpada com seus dois eletrodos (ânodo e cátodo) dentro de um bulbo preenchido de Hg; b) intensidade de emissão de luminosidade da lâmpada.



Fonte: Adaptado de Davidson (2016).

- b) **Monocromador:** monocromadores são equipamentos ópticos com a função de selecionar através de várias faixas do espectro de emissão de luz apenas um comprimento de onda. O comprimento de onda da luz transmitida através do monocromador pode ser alterado pelo usuário. Uma fonte de luminosidade ao passar pelo monocromador forma uma luz

cujo comprimento de onda é ajustável para análises de fluorescência ou absorção.

- c) **Unidade de manipulação de amostra:** esse compartimento deve misturar rapidamente os reagentes dentro da câmara de mistura, coordenando a parada do fluxo e o início da detecção.
- d) **Sistema de detecção:** o sistema de detecção geralmente é composto por um ou mais tubos fotomultiplicadores com a capacidade de analisar as alterações em absorbância, fluorescência ou outro modo de detecção suportado pelo equipamento. Pode conter ou não um fotodiodo para análises de varredura em diferentes comprimentos de onda.
- e) **Computador e software de controle do equipamento:** o software é responsável pelo controle da maioria das funções do equipamento, como: quantidade de reagentes, vazão volumétrica, tempo de leitura, início da aquisição de dados e controle dos motores. É responsável também pela análise dos dados e, em alguns casos, também pelo ajuste dos dados obtidos.
- f) **Banho circulatório com controle de temperatura:** o controle de temperatura é essencial em análises cinéticas. O banho circulatório mantém a temperatura do equipamento e dos reagentes termicamente controladas.

A principal vantagem de se usar o fluxo interrompido é a economia de reagentes e a possibilidade de monitorar a reação durante todo o processo em que ela ocorre. Porém, essa metodologia apresenta um fator limitante chamado “dead time” ou TM, que é o tempo necessário para que ocorra a mistura e o início da aquisição dos dados. O TM médio dos equipamentos presentes no mercado é de 2 ms. Equipamentos modernos, como o SFM 4000/S, quando equipados com seringas pressurizadas e com microcubeta especializadas, reduzem esse período para cerca de 0,25 ms (BATISTELA, 2006; CLARKE; KHALID, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a padronização da desoxigenação da Hb pelo método de fluxo interrompido, foi necessária a elaboração de um protocolo experimental detalhado que descrevesse passo a passo todas as etapas para a realização dos experimentos. A meta-Hb humana foi reduzida inicialmente a oxi-Hb após passagem pela coluna de cromatografia líquida de filtração em gel de exclusão (Sephadex G-25), seguido de diálise para retirada do excesso de DTS presente na amostra e quantificação pelo método de Drabkin. A seguir, todas as reações de desoxigenação foram realizadas no equipamento Stopped Flow Mixer 4000/S (SFM – 4000/S). Os materiais e métodos para a realização dos procedimentos acima descritos estão detalhados a seguir.

3.1 MATERIAIS

O presente trabalho experimental foi elaborado com o uso dos seguintes materiais e equipamentos descritos abaixo:

- Coluna de vidro (80 cm × 2,5 cm);
- Resina Sephadex G-25 (SIGMA ALDRICH);
- Seringas descartáveis de volume de 10 mL;
- Tubos Falcon de volume de 10 mL;
- Membrana de diálise com poro < 64.000 Da do fabricante Spectrum Laboratories;
- Descarpac;
- Espátula de metal;
- Bastão de vidro;
- Béquer de 50mL e 100 mL;
- Suporte com garra universal;
- Proveta de 1000 mL;
- Micropipeta de volume variável;
- Balões volumétricos de 5, 10, 250 e 500 mL;
- Kit de hemoglobina do fabricante Labtest Diagnóstico S.A.

Equipamentos utilizados:

- Equipamento de mistura rápida Stopped Flow Mixer (SFM 4000/S);

- Espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (MOLECULAR DEVICES);
- Destilador de bancada;
- Agitador.

Os reagentes e soluções necessários ao desenvolvimento do experimento:

- **Água destilada;**
- **TAMPÃO Hepes 50 mM pH 7.4:** O Hepes é considerado um dos melhores tampões para uso biológico e vem sendo largamente utilizado em experimentos pois se compara ao pH fisiológico, que fica em torno de 7.36, e também por não ser considerado tóxico para a cultura de células. Possui também alta solubilidade em água e é amplamente recomendado para uso em análise de proteínas. A solução Hepes (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) foi escolhida de acordo com os experimentos de Tsuruga et al. (2010) e Weber et al. (2013). Foram também realizados vários testes e o composto Hepes apresentou melhores resultados em nossos experimentos quando comparado aos resultados do tampão fosfato.
- **Ditionito de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$):** Esse composto, também conhecido como hidrossulfito de sódio, é um pó branco de aparência cristalina e leve odor de enxofre. É o reagente mais comum e o mais apropriado para ser utilizado tanto para a desoxigenação quanto para redução de heme pigmentos como a hemoglobina. Nos experimentos de redução, age como um potente redutor, transformando a forma meta-Hb (Fe^{+3}) na forma hemoglobina (Fe^{+2}). Esse sal sódico também remove o oxigênio da oxi-Hb e, por esse motivo, é utilizado até hoje em experimentos de desoxigenação de proteínas (DALZIEL; O'BRIEN, 1957; MCKENNA; GUTHEIL; SONG, 1991).
- **Meta-hemoglobina liofilizada ETA- H7379 (SIGMA ALDRICH):** A meta-Hb é uma variação da hemoglobina que se encontra no estado férrico (Fe^{3+}) e não se liga ao oxigênio. Após liofilizada apresenta-se na forma de um pó de cor

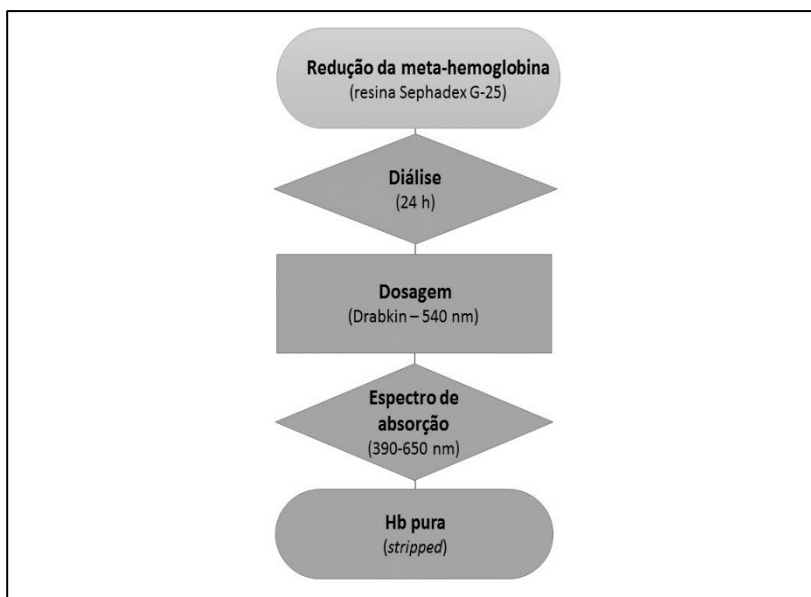
marrom escuro e deve ser preferencialmente diluída em água ou tampão em uma concentração de 20 mg/mL, conforme recomendações do fabricante.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção da Oxi-Hemoglobina Pura (*stripped*)

O processo de obtenção da hemoglobina, de modo que seja possível a realização do experimento de liberação do oxigênio, consiste de algumas etapas conforme descritas no fluxograma da Figura 15:

Figura 15 - Fluxograma contendo todas as etapas da obtenção da hemoglobina pura.

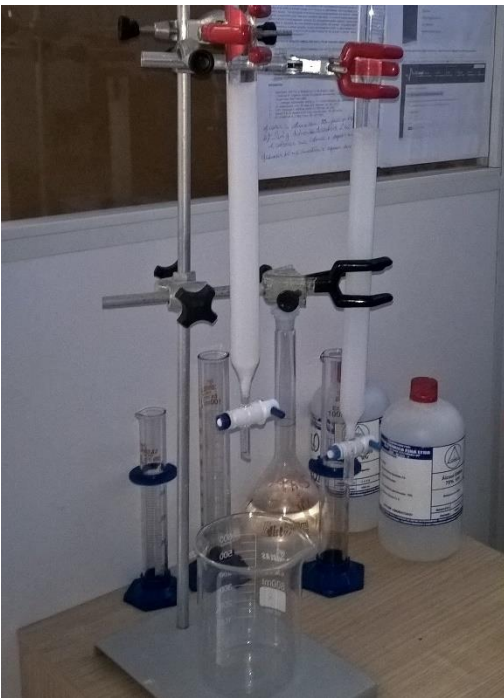


Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

3.2.1.1 Redução da meta-hemoglobina pela filtração em coluna Sephadex G-25

A resina Sephadex G-25 é recomendada para a maioria dos experimentos de separação de proteínas globulares pois apresenta excelente resultado na remoção de sais e outros contaminantes. O princípio de funcionamento da resina de gel de filtração por exclusão molecular consiste em separar os componentes de uma amostra em dois grupos, sendo o primeiro contendo as substâncias de maior peso molecular, que são excluídos do gel e eluem primeiro. Já os compostos do segundo grupo, de menor peso molecular ficam aderidos aos poros da resina para serem eluídos por último (Figura 16) (SIGMA ALDRICH).

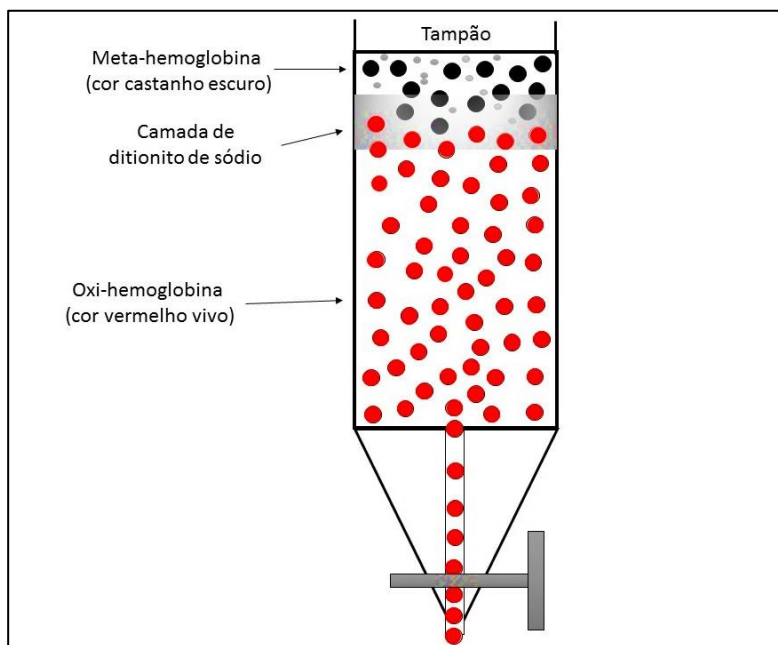
Figura 16 – Coluna de resina Sephadex G – 25.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

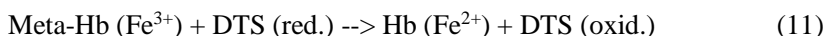
A coluna de Sephadex G-25 foi preparada com uma altura de 25 cm de resina empacotada em uma coluna de vidro (80 cm × 2,0 cm), equilibrada com tampão HEPES pH 7,4, usado como eluente. Em seguida, foram adicionados 2 mL do mesmo tampão contendo 200 mg de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (BENESCH; BENESCH; YU, 1968; DIXON; MCINTOSH, 1967; WEBER; FAGO; CAMPBELL, 2014). A meta-Hb (cor castanho escuro) desce rapidamente, entrando em contato com o agente redutor, resultando em desoxi-Hb (cor púrpura), conforme exemplificado na Figura 17:

Figura 17 - A meta-Hb (cor castanho escuro) é reduzida a oxi-Hb (cor vermelho) após contato com DTS. Os fosfatos ficam aderidos aos poros da resina durante a passagem da amostra pela coluna.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

O processo de redução da meta-Hb ao reagir com o agente redutor ditionito de sódio pode ser demonstrado conforme Equação (11):



3.2.1.2 Diálise da hemoglobina

A diálise da hemoglobina foi realizada através do uso de uma membrana de corte de 30 kDa (Spectrum Laboratories) colocada em becker contendo tampão Hepes 50 mM pH 7,4 e mantida sobre agitação no refrigerador sob temperatura controlada durante 24 h, sendo realizadas três trocas de tampão nesse período. Esse processo retira o ditionito em excesso na solução de hemoglobina, que atravessa o poro da membrana e permanece no tampão, mantendo a solução de hemoglobina isenta desse contaminante (Figura 18) (WEBER et al., 2013).

Figura 18 - Procedimento de diálise da Hb. O excesso de ditionito de sódio presente na amostra atravessa o poro da membrana de tamanho 30 Kda e permanece misturado ao tampão na parte externa da membrana.



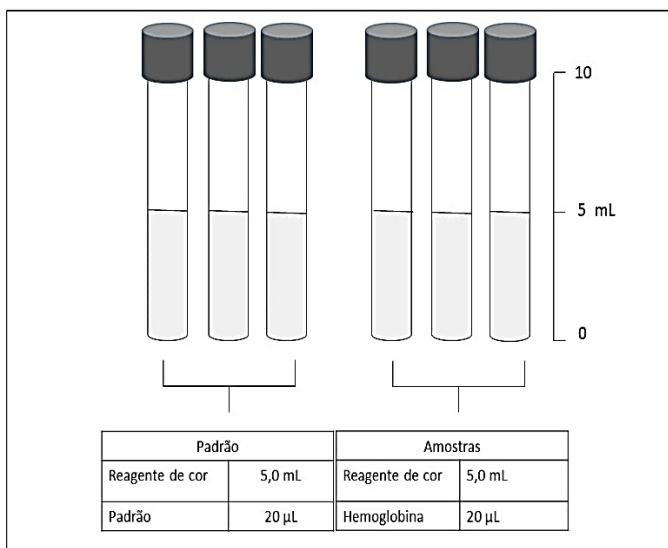
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

3.2.1.3 Dosagem da Hemoglobina

A concentração da hemoglobina foi obtida pelo método de Drabkin usando o kit de dosagem de hemoglobina Labtest. O kit é composto por um reagente de cor (ferrocianeto de potássio + cianeto de potássio + surfactante) mais um padrão de hemoglobina com

concentração conhecida. O princípio desse método consiste na oxidação do átomo ferroso (Fe^{2+}) do grupo heme da hemoglobina ao estado férrico (Fe^{3+}) pelo ferrocianeto (reagente de cor), formando hemiglobina (Hi) que, combinada com o cianeto ionizado, produz cianeto de hemoglobina (HiCN), o qual é medido em comprimento de onda de 540 nm (DRABKIN; AUSTIN, 1935). O procedimento realizado foi de três diluições para a amostra de hemoglobina e outras três para o padrão que acompanha o kit. Em seis tubos Falcon (3 amostras + 3 padrões) foram acrescentados 5 mL de reagente de cor em cada um deles (Figura 19). Nos três frascos correspondentes as amostras foram adicionados 20 μL de hemoglobina e nos demais 20 μL do padrão de Hb (LABTEST DIAGNÓSTICO S.A).

Figura 19 – Sequência das diluições para determinação da concentração de Hb pelo método de Drabkin



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Após a homogeneização de cada um dos tubos individualmente, foi respeitado o tempo de 5 min (conforme recomendação do fabricante) para a realização da leitura no espectrofotômetro Spectramax Plus 384 acertando o zero com o reagente de cor. O cálculo da concentração deve ser feito utilizando o produto Padrão de Hemoglobina:

$$\text{Hb (g/dL)} = 10^* \times \frac{\text{Absorbância da amostra (média)}}{\text{Absorbância do padrão (média)}} \quad (12)$$

* Concentração do padrão de hemoglobina = 10g/dL.

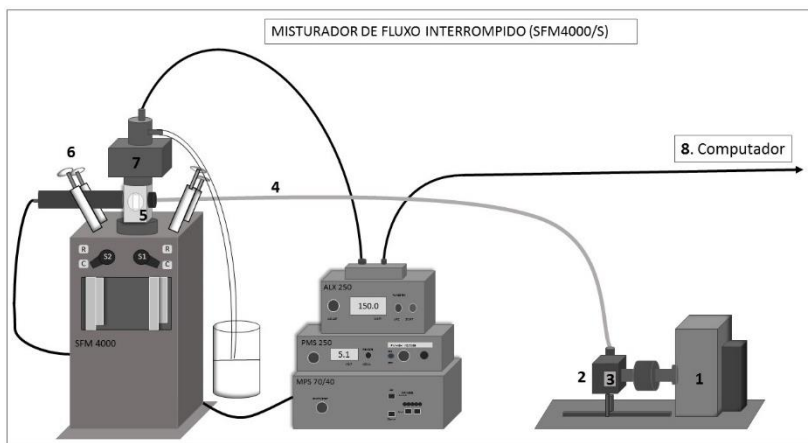
3.2.1.4 Espectro de absorção da hemoglobina

A solução da hemoglobina foi submetida a análise através de varredura nos comprimentos de onda de 390 a 650 nm no espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) para verificação do processo de conversão para oxi-Hb. As formas de hemoglobina são diferenciadas pelos picos de absorbância bem característicos de cada estado conformacional. A meta-Hb apresenta pico máximo em 405 e picos menores em 500 e 630 nm. A oxi-Hb tem pico máximo em 415 nm e picos menores na banda Q em 541 e 577 nm. A forma desoxigenada possui pico máximo de absorbância em 430 nm e pico menor em 555 nm (NAOUM; RADISPIEL; MORAES, 2004; TOSQUI; COLOMBO, 2011).

3.2.2 O método de fluxo interrompido do equipamento SFM 4000/S

Diferente do modelo apresentado anteriormente na Figura 13, o SFM 4000/S apresenta uma válvula de parada ao invés da seringa de frenagem. Essa válvula destaca-se como grande inovação tecnológica nos equipamentos de fluxo interrompido atualmente comercializados. O funcionamento desse novo sistema, denominado “*hard stop*” ou parada brusca, ocorre por meio da sincronização entre os motores dos pistões que fecham a válvula simultaneamente após os motores pararem e interrompem o fluxo, amenizando com isso a formação de bolhas. Nessa técnica, as soluções são colocadas em reservatórios e injetadas rapidamente (milissegundos) para uma câmara de mistura, onde o fluxo é interrompido por meio de uma válvula que é fechada automaticamente pelo software do equipamento, dando início imediato a aquisição dos dados de absorbância em função do tempo (Figura 20).

Figura 20 - Representação do conjunto de componentes do equipamento *Stopped Flow Mixer* (SFM-4000/S): a lâmpada Xe (Hg) de 150 W (1) emite luz de alta intensidade que incide até o monocromador (2), o qual possui o comprimento de onda (3) fixo que é selecionado pelo usuário. O cabo de fibra óptica (4) é responsável pelo transporte da luz até a microcubeta (5). Os reagentes são injetados pelas seringas (6) rapidamente para uma câmara de mistura, através de uma eletroválvula que compõe o sistema de parada brusca chamado *hard stop* (7) interrompendo o fluxo e iniciando aquisição dos dados no computador (8) pelo software.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

O tempo entre a mistura e o início da aquisição de dados é chamado de “*dead time*” ou tempo morto (TM). Esse período é o fator mais importante da técnica e faz com que o equipamento SFM- 4000/S, da empresa francesa Bio-Logic Science Instruments, seja o mais rápido do mercado.

Em equipamentos usados em trabalhos anteriores esse tempo era de cerca de 2 ms. Nos modelos atuais, tais como o utilizado no presente estudo, o tempo morto fica em torno de 0,4 ms e, dependendo do tipo de microcubeta, pode chegar a 0,25 ms. A microcubeta é um recipiente confeccionado em quartzo, com bordas escuras, composta por dois caminhos ópticos (0,08 cm em ambas as direções), irradiada por uma luz (lâmpada de xenônio - acrescida de mercúrio de 150 W). Essa iluminação é fornecida pelo sistema óptico MOS/200. O MOS/200 é composto pela lâmpada (Xe-Hg) e por um monocromador onde é selecionado o comprimento de onda desejado. A luz monocromática é transmitida por

um cabo de fibra óptica até a microcubeta dentro da cabeça de observação. O controle do tubo fotomultiplicador e a filtragem do sinal é realizada pelo dispositivo PMS-250 (“*Photomultiplier control unit*”).

Conforme já citado, durante os experimentos foi utilizada a microcubeta de absorvância ($\mu\text{FC-08}$), que é, segundo o fabricante, uma das mais eficientes do mercado. O tempo morto obtido foi de 0,4 ms.

A prática de fluxo interrompido pode ser utilizada para medir reações na escala de milissegundos (10^{-3} s) e também permite trabalhar com quantidades muito pequenas (na ordem de μL) de reagentes (BATISTELA et al, 2006; FRESKGDARD; BERGENHEM; CARLSSON, 1992).

3.2.2.1 Curvas de calibração

A curva de calibração da oxi-Hb foi obtida através das medidas de absorvância de diferentes concentrações da hemoglobina oxigenada avaliadas no próprio equipamento. O procedimento de leitura foi efetuado através da utilização de uma seringa contendo oxi-Hb no compartimento 3 com diferentes diluições (2; 5; 10; 12; 15; 20; 25; 30; 40; 50 e 60 μM) em tampão Hepes. Para cada concentração de proteína utilizada eram efetuados alguns disparos e o resultado obtido era uma reta com a absorvância correspondente para cada amostra analisada. Os dados de concentração em função de absorvância foram plotados graficamente e fez-se uma regressão linear para obtenção da equação da reta que melhor se ajustava aos pontos experimentais no software Origin®.

Os pontos para a curva de calibração da desoxi-Hb foram obtidos usando os valores finais de absorvância após o término da reação para diferentes concentrações iniciais de oxi-Hb no comprimento de onda de 415 nm. Para isso, considerou-se que a reação de desoxigenação da hemoglobina com o DTS é completa, conforme Jorge (2013).

3.2.2.2 Padronização do experimento de desoxigenação da oxi-hemoglobina b no SFM 4000/S

Para a padronização dos experimentos de desoxigenação foram adotados os seguintes passos (Figura 21):

a) Determinação da quantidade de hemoglobina a ser usada: as concentrações iniciais de oxi-Hb utilizadas foram de 10; 20; 30; 40 e 50 μM (quantificação feita por espectrofotometria usando o reagente de Drabkin no comprimento de onda de 540 nm). Concentrações maiores

foram utilizadas, porém apresentaram problemas de mistura e entupimento do equipamento, resultando numa mistura viscosa e ineficiente.

b) Determinação da quantidade de ditionito de sódio: a concentração de DTS utilizada para desoxigenar a oxi-Hb foi de 8,62 mM que, ao ser misturada no equipamento na proporção de 1:1, resultou numa concentração de 4,31 mM. Seguindo os dados de trabalhos anteriores encontrados na literatura, foram testadas paralelamente algumas concentrações de ditionito de sódio: 46; 26; 8,62; 6,0 e 2,6 mM (BRITAIN; SIMPSON, 1989; COIN; OLSON, 1979; JIA et al., 2004; JORGE, 2013; HOLLAND; SHIBATA; PIPER, 1985). Entretanto, a concentração ideal, de menor viscosidade e melhor mistura para o processo de desoxigenação da oxi-Hb foi a utilizada por Jia et al., (2004) de 8,62 mM. Em concentrações maiores de DTS foi observado o surgimento de aumento de viscosidade na solução, dificultando o processo de mistura rápida dos reagentes.

c) Vazão volumétrica (*total flow rate*): é a vazão (mL/s) em que os reagentes serão injetados no misturador, gerando a mistura que será analisada posteriormente na microcubeta. O equipamento SFM 4000/S suporta uma vazão máxima de 16 mL/s, sendo 8 mL/s por seringa. No entanto, velocidades muito altas podem gerar a ocorrência de cavitação (bolhas) e misturas não homogêneas. Foram realizados vários disparos começando com a velocidade máxima e, entre cada teste, a vazão era diminuída até que se obteve a vazão volumétrica ideal de 9 mL/s. Esse foi um aspecto importante durante o procedimento de padronização para obtenção de uma mistura mais homogênea, amenizando a ocorrência de possíveis interferentes.

d) Quantidade de reagentes na microcubeta (*total volume/shot*): o volume total de solução a ser injetada na microcubeta deve garantir a limpeza do caminho entre o misturador e a microcubeta (volume morto) e também substituir completamente o líquido presente na microcubeta referente ao disparo anterior. Esse procedimento garante que a solução analisada corresponda somente a mistura do disparo atual. O software estabelece automaticamente uma quantidade mínima três vezes maior que o volume morto, sendo a configuração mantida em 150 μ L na proporção de 1:1 μ L de ditionito de sódio.

e) Tempo morto estimado (*estimated dead time*): o tempo entre a mistura e o início da aquisição de dados é chamado tempo morto (TM). Esse tempo é proporcional a vazão volumétrica, pois é o período necessário para que a mistura percorra o centro do último misturador (M3) até o centro da microcubeta, para então ser atravessada pelo feixe de luz

e dar início a aquisição dos dados de absorvância em função do tempo. Quanto menor for o TM, maior será a capacidade de leitura do equipamento nos primeiros instantes da reação. Porém, um elevado valor de vazão com objetivo de diminuir o TM pode ocasionar interferências, como a formação de bolhas, resultando em misturas não homogêneas. O TM do presente estudo foi ajustado para 0,4 ms, que foi o valor mínimo encontrado para garantir uma boa mistura sem ocorrência de eventuais interferências. Abaixo desse valor, o equipamento não produziu resultados. Na literatura, os trabalhos realizados foram próximos desses valores, tal como o de Jia et al. (2013), que obtiveram um TM de 1,3 ms. Segundo Gibson (1959), para obtenção de um resultado satisfatório que consiga capturar os primeiros valores de absorvância logo nos instantes iniciais da reação, é necessário que esse tempo seja inferior a 1 ms.

Figura 21 - Sequência de configuração para padronização dos experimentos de desoxigenação da oxi-Hb.

The screenshot shows the 'Mixing sequence' software interface with the following configuration details:

- Mixing ratio:** S1: 0, S2: 0, S3: 1, S4: 1.
- Volume:** Total volume / shot: 150 µl. Individual syringe settings: S1 (0 µl, 0 mL/s), S2 (0 µl, 0 mL/s), S3 (75 µl, 4.50 mL/s), S4 (75 µl, 4.50 mL/s).
- Total flow rate:** 9.0 mL/s.
- Start of data acquisition:** At stop (selected), 10 ms before the stop.
- Sequence:** Ready button.
- Estimated dead time:** 0.4 ms.
- Configuration table:**

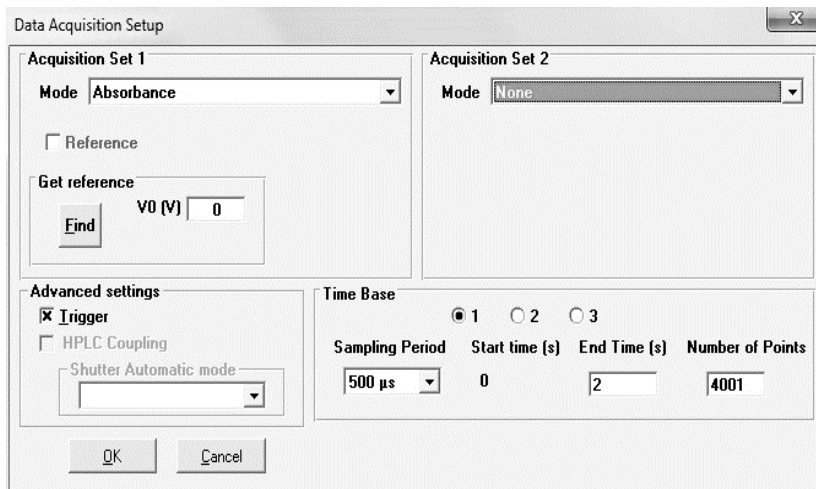
	Content of syringes	Initial concentration	Final concentration
Syringe 1	10 ml HEPES		
Syringe 2	10 ml HEPES		
Syringe 3	10 ml DTS	8,6 mM	4,3 mM
Syringe 4	10 ml oxi-Hb	20 µM	10,0 µM
- Buttons:** Load, Save As, Comments, Print, SFM Options, Close.

Fonte: Biologic Science Instruments (2016).

f) Tempo de aquisição de dados (Data Acquisition Setup): as aquisições dos dados de absorvância em função do tempo foram coletadas automaticamente pelo software que está acoplado ao equipamento SFM 4000/S. O tempo total de observação da reação foi fixado em dois

segundos gerando uma quantidade de 4001 pontos, significando que a cada 500 μs era obtido um ponto no gráfico (Figura 22).

Figura 22 - Janela de configuração do modo de aquisição de dados. O número total de pontos coletados foi de 4001, sendo gerado um a cada 500 μs durante o período de tempo de 2 segundos.



Fonte: Biologic Science Instruments (2014).

3.2.2.3 Desoxigenação da hemoglobina no SFM 4000/S

Após o preparo das diluições das amostras de hemoglobina e ditionito de sódio, o equipamento foi ajustado da seguinte forma: modo avançado; aquisição de dados por absorvância. A microcubeta utilizada foi a $\mu\text{FC} - 08$ e o comprimento de onda selecionado foi de 415 nm. A oxi-Hb possui maior pico na banda de Soret (415 nm) e outros picos menores em 540 nm e 576 nm (banda Q). Foi selecionado o comprimento de onda correspondente a banda que emitiu o melhor sinal, que foi de 415 nm.

Os experimentos foram monitorados por meio de um termômetro para se manter uma temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), a fim de se obter um resultado cinético semelhante em todas as experimentações a serem realizadas.

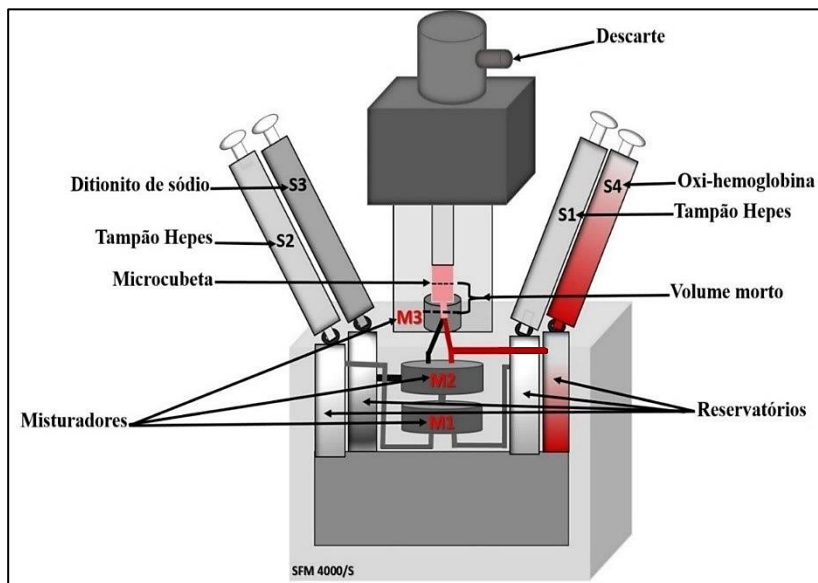
O SFM – 4000/S é equipado com quatro seringas, sendo que cada seringa apresenta um motor individual que pode tanto ser acionado de

forma manual ou automática. Para a realização dos experimentos de desoxigenação da hemoglobina foram utilizadas as bombas 3 e 4 do SFM-4000/S, conforme recomendações do fabricante, que aconselha que os reagentes sejam usados nesses compartimentos. Nas bombas 1 e 2 foram utilizados somente tampão Hepes 50 mM pH 7,4, o qual foi utilizado para fazer o “branco” do equipamento e permanecem fechadas durante o experimento para não interferirem na reação. O branco é essencial para zerar a absorbância, calibrando, dessa forma, o equipamento e garantindo a exatidão das leituras espectrofotométricas. Após esse procedimento, foram realizados disparos somente com tampão Hepes pH 7,4 onde foram verificados a correta calibração do mesmo.

Na bomba 3 foi inserido DTS e na bomba 4 a oxi-Hb. Após vários testes de mistura, foram realizados um total de 20 disparos para cada concentração de oxi-Hb.

A solução de DTS colocada na seringa S3 enche o reservatório e passa sozinha pelo misturador M2 chegando até o último misturador M3 (localizado sob a microcubeta) para então, ser misturada com a Hb purificada. A Hb purificada que sai da seringa S4 enche o reservatório e vai direto para o misturador M3. Em seguida, os reagentes seguem para a microcubeta para análise final (Figura 23). Todos os disparos foram repetidos no mínimo 20 vezes para as concentrações iniciais de 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM e 100 μM de oxi-Hb avaliadas, mantendo a concentração do ditionito de sódio constante e o comprimento de onda fixado em 415 nm para a reação de desoxigenação.

Figura 23 - Visualização interna do equipamento SFM 4000/S com seus respectivos misturadores (M1, M2 e M3). O primeiro misturador M1 é responsável pelas seringas S1 e S2 e não é utilizado posteriormente nos experimentos. Os reagentes são colocados nas seringas S3 e S4. A solução de ditionito de sódio da seringa S3 passa direto pelo misturador M2 e chega ao último misturador M3 que está localizado sob a microcubeta, para então ser misturado com a solução de hemoglobina purificada da seringa S4 (oxi-Hb).



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

3.2.2.4 Análise dos dados

3.2.2.4.1 Transformação dos valores de absorvância em concentração.

Os valores de absorvância foram convertidos em concentração através da Lei de Beer Lambert:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (13)$$

sendo:

A = absorvância,

C = concentração da proteína,

ϵ = coeficiente de extinção molar,

l = caminho óptico da microcubeta ($l = 0,08$ cm).

Após a identificação da fase linear da curva-padrão, obteve-se a equação da reta por regressão linear utilizando o software Origin®, que permite estimar o coeficiente angular equivalente a $\varepsilon \cdot l$.

3.2.2.4.2 Interferência da absorbância da forma desoxigenada

Conforme a Figura 7 apresentada no presente trabalho, os espectros de absorção das formas oxi-Hb e desoxi-Hb possuem valores muito próximos uns dos outros. A forma desoxigenada possui pico máximo em 430 nm, mas também apresenta um valor significativo de absorção no comprimento de onda da forma oxigenada (415 nm). Deste modo, a absorbância total medida no equipamento é o resultado da soma das absorbâncias da forma oxigenada com a forma desoxigenada da hemoglobina (Equação 14):

$$A_{\text{total}} = A_{\text{oxi-Hb}} + A_{\text{desoxi-Hb}} \quad (14)$$

Sabendo que cada um dos termos da direita da Equação (14) pode ser substituído por sua respectiva curva de calibração, obtém-se a Equação (15).

$$A_{\text{total}} = \varepsilon_{\text{oxi-Hb}} \cdot C_{\text{oxi-Hb}} \cdot l + \varepsilon_{\text{desoxi-Hb}} \cdot C_{\text{desoxi-Hb}} \cdot l \quad (15)$$

A concentração total de hemoglobina no meio é constante e igual a concentração inicial. Sabendo que a hemoglobina pode estar na forma oxigenada ou desoxigenada, a concentração total consiste na soma da concentração dessas duas formas. Sendo assim, podemos escrever a concentração da desoxi-Hb segundo a Equação 16.

$$C_{\text{desoxi-hb}} = C_{\text{oxi-Hb}}^0 - C_{\text{oxi-Hb}} \quad (16)$$

Substituindo a $C_{\text{desoxi-hb}}$ da Equação (16) na Equação (15), obtém-se a expressão especificada para a $C_{\text{(oxi-Hb)}}$ em função da absorbância mensurada, de acordo com a Equação (17):

$$C_{\text{oxi-Hb}} = \frac{A_{\text{total}} - \varepsilon_{\text{desoxi-Hb}} \cdot C_{\text{oxi-Hb}}^0}{\varepsilon_{\text{oxi-Hb}} - \varepsilon_{\text{desoxi-Hb}}} \quad (17)$$

3.2.2.4.3 Cálculo de k_{off}

A reação de desoxigenação da oxi-Hb, quando realizada por intermédio de excesso de DTS, é irreversível. Globalmente, desconsiderando a possibilidade de etapas intermediárias, essa reação pode ser expressa conforme a Equação (18):



A princípio, a velocidade da reação expressa na Equação (18) pode ser escrita conforme a Equação (19):

$$r = V \cdot \frac{dC_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}}{dt} = k_{on} C_{\text{O}_2}^4 C_{\text{Hb}}^1 \cdot V - k_{off} C_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4} \cdot V \quad (19)$$

sendo que:

r : velocidade de reação;

$\frac{dC_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}}{dt}$: derivada da oxi-Hb em função do tempo;

k_{on} : constante de segunda ordem da ligação do oxigênio com a desoxi-Hb;

k_{off} : constante de primeira ordem da dissociação do oxigênio com a oxi-Hb;

C_{O_2} : concentração de oxigênio na mistura;

C_{Hb} : concentração de desoxi-Hb na mistura;

$C_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}$: concentração de oxi-Hb na mistura.

Segundo Holland *et al.*, (1977), a reação da oxi-Hb com excesso de DTS é irreversível. Desse modo, a conversão de oxi-Hb a desoxi-Hb pode ser aproximada por meio de uma reação de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, a Equação (19) pode ser simplificada à Equação (20).

$$\frac{dC_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}}{dt} = -k_{off} C_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4} \quad (20)$$

A Equação (20) apresenta solução analítica, cujo resultado está expresso na Equação (21):

$$C_{Hb(O_2)_4} = C_{Hb(O_2)_4}^{inicial} \cdot e^{k_{off} \cdot t} \quad (21)$$

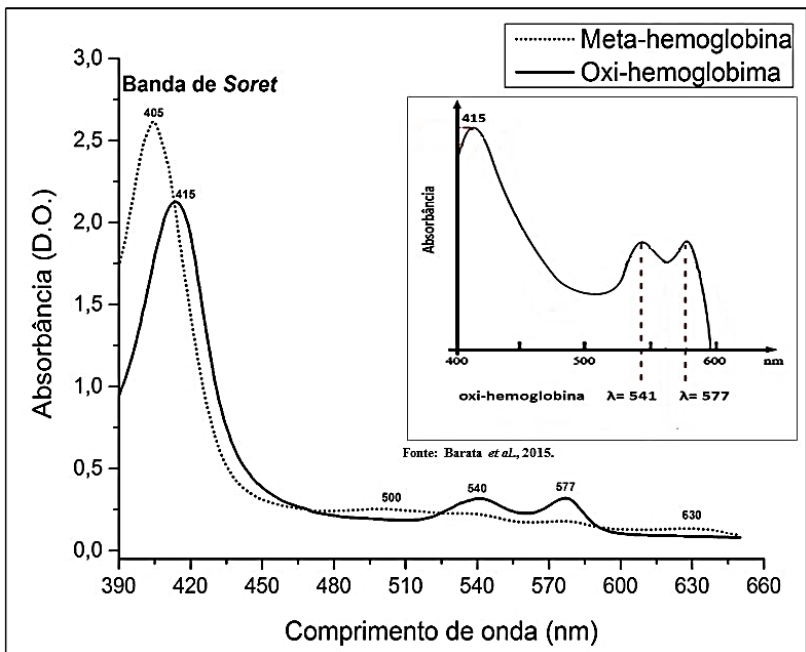
Os valores de k_{off} foram obtidos através do ajuste de funções exponenciais às curvas de concentração de oxi-Hb ao longo do tempo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REDUÇÃO DA META-HEMOGLOBINA

A meta-Hb, antes da passagem pela coluna de gel Sephadex G-25, apresentava picos de absorção em 405 na região de Soret, 500 e 630 nm na banda Q. Esperava-se que, após a passagem pela coluna de gel Sephadex G-25, o ferro em estado férrico fosse reduzido ao estado ferroso em contato com DTS, possibilitando a ligação do oxigênio à hemoglobina. Durante a descida da hemoglobina pela coluna, ela entraria em contato com oxigênio tornando-se oxi-Hb. A conversão esperada ocorreu, conforme pode ser observado na Figura 24 pelos espectros que apontam picos em 415, 540 e 577 nm, que corresponde aos da oxi-Hb.

Figura 24 - Redução da meta-Hb a oxi-Hb após a passagem pela coluna de gel Sephadex G-25. A meta-Hb (linha pontilhada) é reduzida após a passagem pela coluna formando oxi-Hb (linha sólida) em comparação com a literatura (gráfico menor).



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

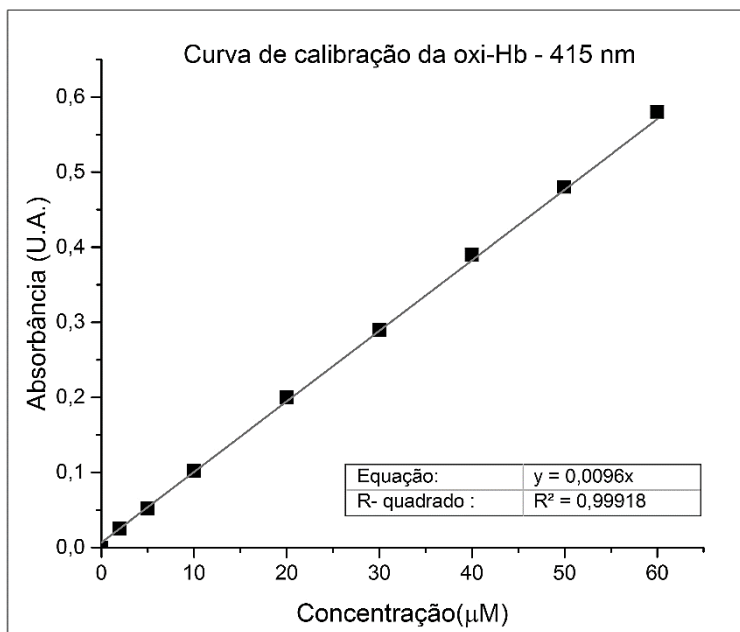
4.2 DOSAGEM DA OXI-HEMOGLOBINA

A concentração de oxi-Hb da solução mãe (após a purificação), determinada pelo método de Drabkin, foi de um valor médio em torno de 1,23 mg/dL, com um desvio padrão de 0,1 mg/dL.

4.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A curva padrão da forma oxigenada da hemoglobina apresentou um comportamento linear em todas as concentrações utilizadas, com um valor de coeficiente de extinção molar de $\epsilon = 0,0096 \mu\text{M} \times \text{cm}^{-1}$ (Figura 25). Convém ressaltar que, no equipamento SFM 4000/S, o caminho óptico da microcubeta é de 0,08 cm, ou seja, bem menor do que o padrão utilizado pela maioria dos equipamentos espectrofotométricos (1 cm). Para a correção desse valor e transformação no sistema internacional de medidas ($\text{mM} \times \text{cm}^{-1}$), dividiu-se o resultado pelo caminho óptico da microcubeta obtendo um valor de $\epsilon = 120 \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. O coeficiente de extinção encontrado por Antonini e Brunori (1971) em pH 7.0 e temperatura de 20° C, no comprimento de onda de 415 nm foi de $128 \text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. A diferença em relação a literatura pode ser explicada devido ao modo de preparação da hemoglobina, visto que no presente trabalho foi utilizado tampão ao invés de água, sendo também realizado em condições diferentes de pH e temperatura (pH= 7,4 e T = 25° C) (ASSEDELFT; ZIJLSTR, 1975).

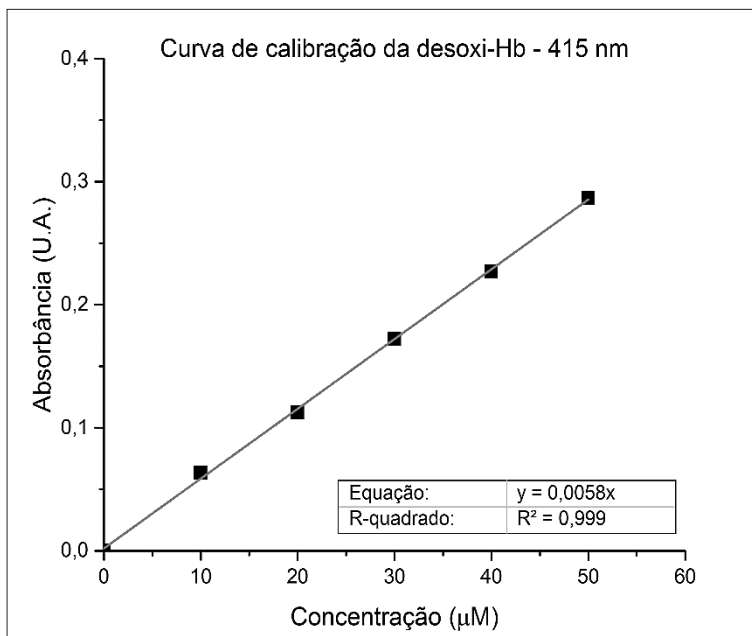
Figura 25 - Curva de calibração da forma oxigenada da hemoglobina no comprimento de onda de 415 nm (banda de Soret).



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Para a subtração da contribuição da absorção da desoxi-Hb na absorbância total mensurada no equipamento, foi realizada uma curva de calibração para a forma desoxigenada (Figura 26). O valor do coeficiente de extinção para a desoxi-Hb encontrado foi de $\epsilon = 0,058 \mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Figura 26 - Curva de calibração da desoxi-Hb no comprimento e onda de 415 nm (banda de Soret).

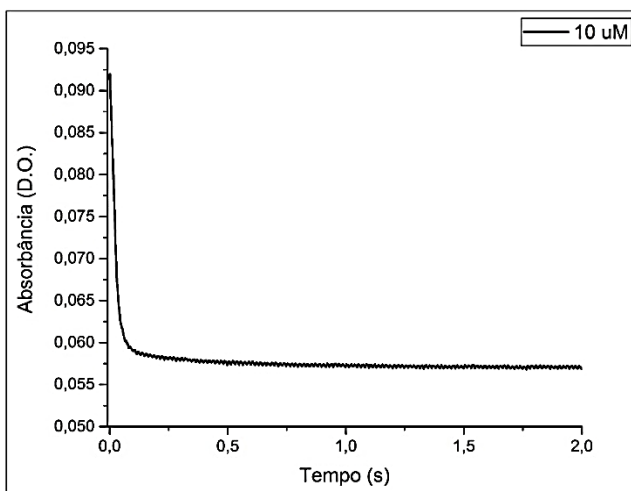


Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016)

4.4 GRÁFICOS DE ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO

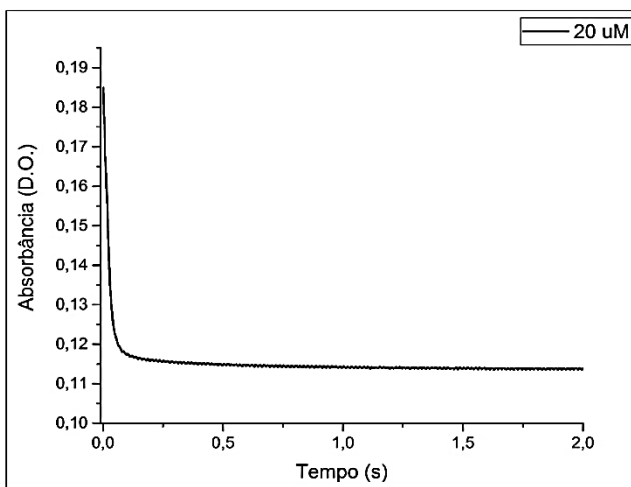
Os gráficos correspondentes as Figuras 27 a 31 demonstram os dados de absorbância em função do tempo coletados diretamente do SFM 4000/S para cada concentração. Pode-se notar que a reação ocorre rapidamente (milissegundos). O gráfico de absorbância em função do tempo com todas as concentrações de oxi-Hb utilizadas é representado pela Figura 32. Um aspecto importante a ser observado é que o valor de absorbância no final da reação fica bem distante do zero (eixo y). Tal fato pode ser explicado devido a interferência provocada pela forma desoxigenada que apresenta um significativo valor de absorbância no comprimento de onda de 415 nm.

Figura 27 - Gráfico de absorvância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 10 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).



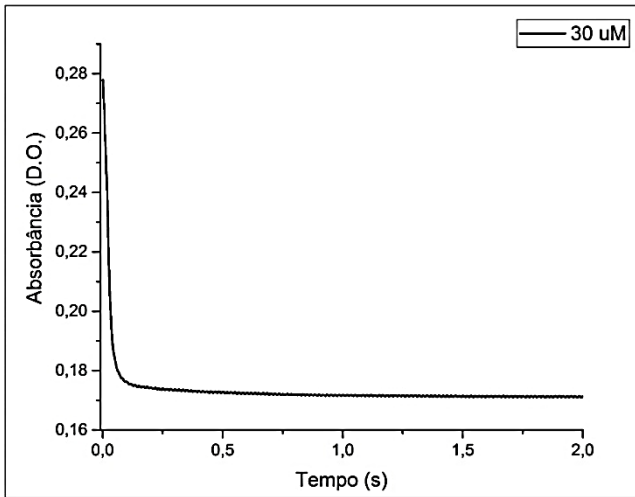
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 28 - Gráfico de absorvância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 20 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).



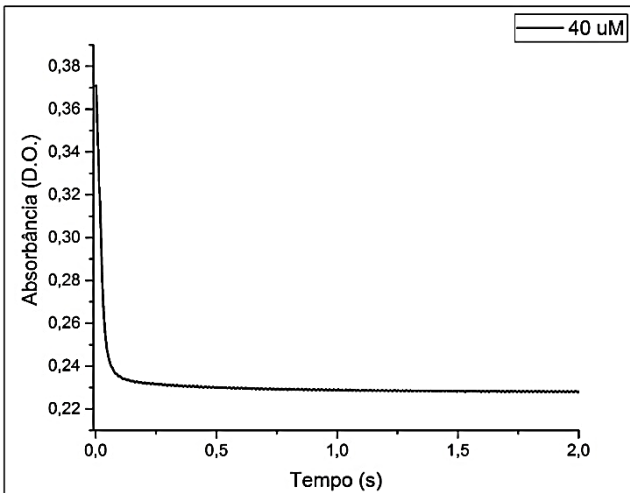
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 29 - Gráfico de absorvância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 30 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).



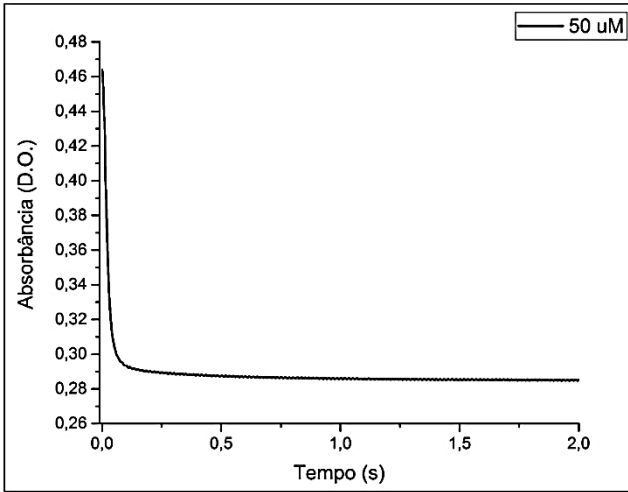
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 30 - Gráfico de absorvância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 40 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).



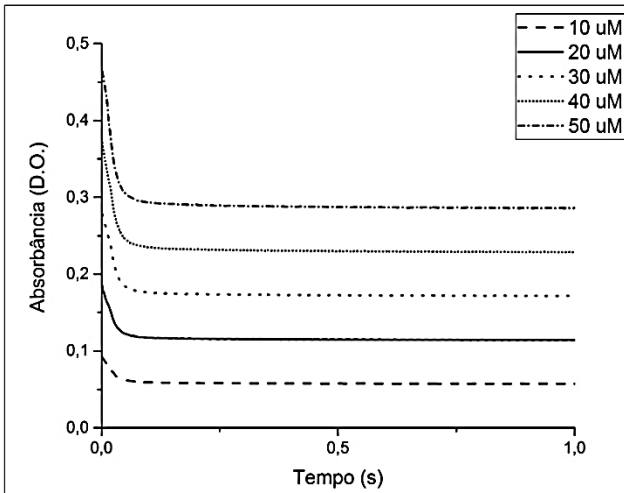
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 31 - Gráfico de absorvância da oxi-Hb em função do tempo para a concentração de 50 μM no comprimento de onda de 415 nm (região de Soret).



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 32 - Gráfico de absorvância de todas as concentrações de hemoglobina utilizadas no equipamento SFM 4000/S no comprimento de onda de 415 nm.

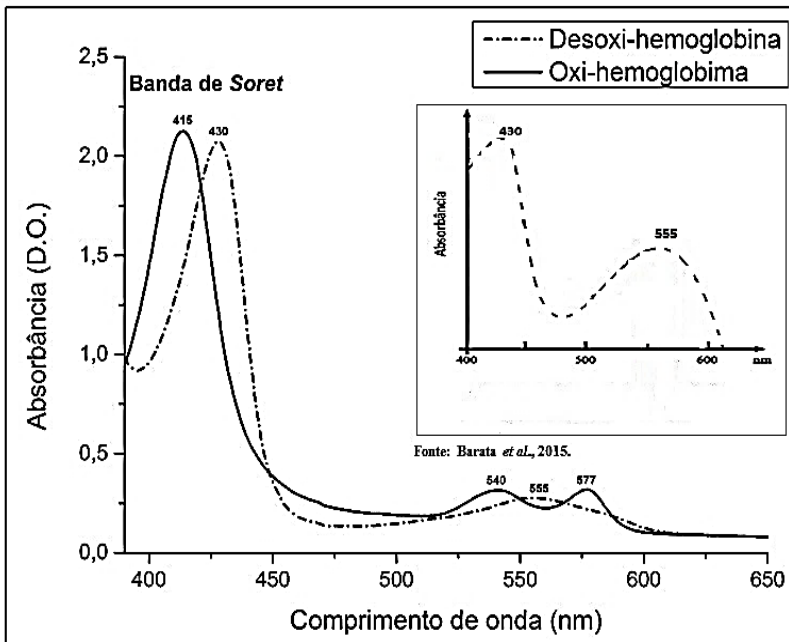


Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

4.5 DESOXIGENAÇÃO COMPLETA DA OXI-HEMOGLOBINA

Como a curva de calibração da desoxi-Hb está apoiada na ideia de que a reação de desoxigenação é completa, verificou-se que a oxi-Hb foi totalmente convertida a desoxi-Hb com os respectivos picos de absorvância correspondentes a forma desoxigenada da proteína (Figura 33). Os valores máximos de absorvância em 430 e 555 nm são típicos da desoxi-Hb e sugerem, dessa forma, a total desoxigenação da hemoglobina.

Figura 33 - Espectro da varredura da oxi-Hb antes da mistura (linha contínua) e após a mistura (linha pontilhada) no SFM 4000/S, demonstrando a formação da desoxi-Hb com seus picos específicos (430 e 555 nm) em comparação com a literatura (gráfico menor).

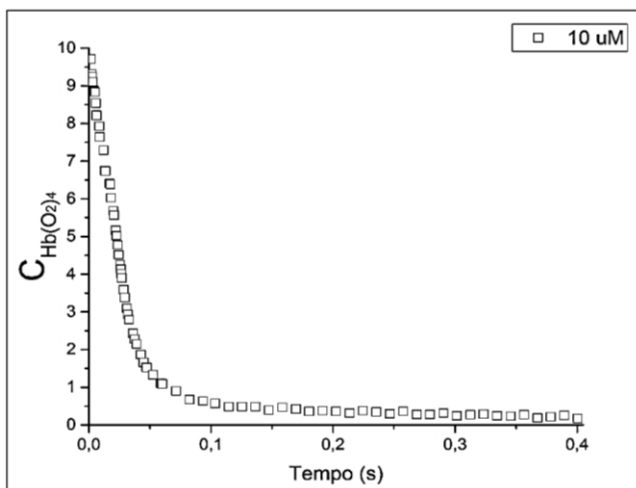


Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

4.6 GRÁFICOS DE CONCENTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO

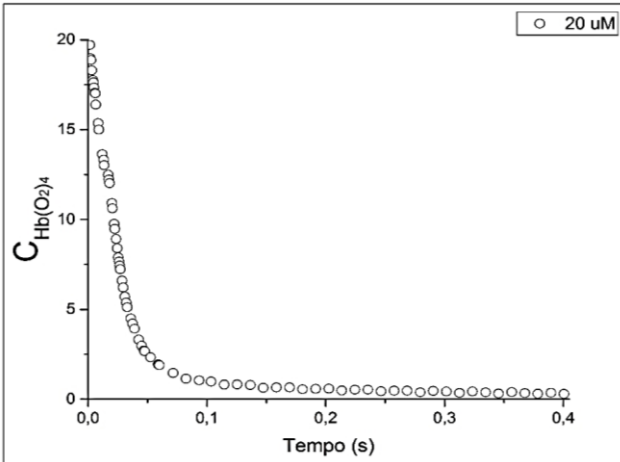
Os gráficos apresentados nas Figura 34 a 38 apresentam os valores de concentração em função do tempo para cada solução de oxi-Hb analisada. É possível observar que a dinâmica é coerente com a hipótese de reação irreversível. Vale destacar que a hipótese de reação completa conduz os valores finais de concentração de oxi-Hb para zero.

Figura 34 - valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.



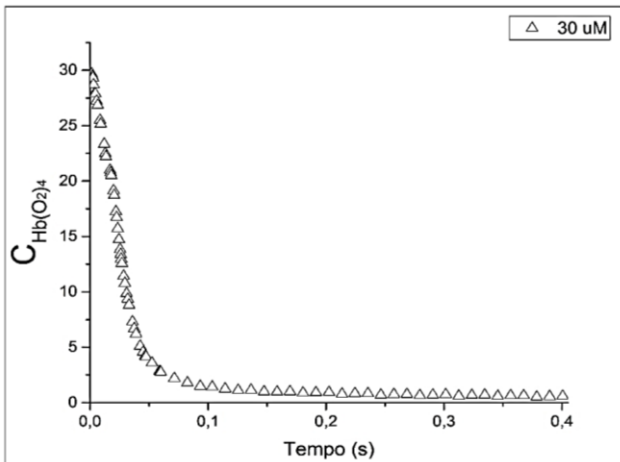
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 35 - Gráfico da concentração de 20 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.



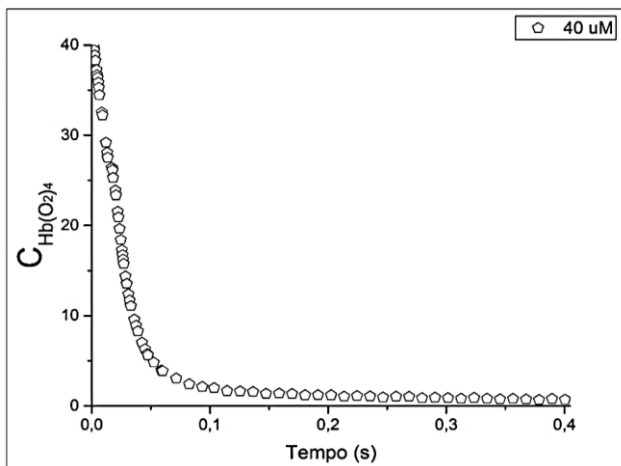
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 36 - Gráfico da concentração de 30 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.



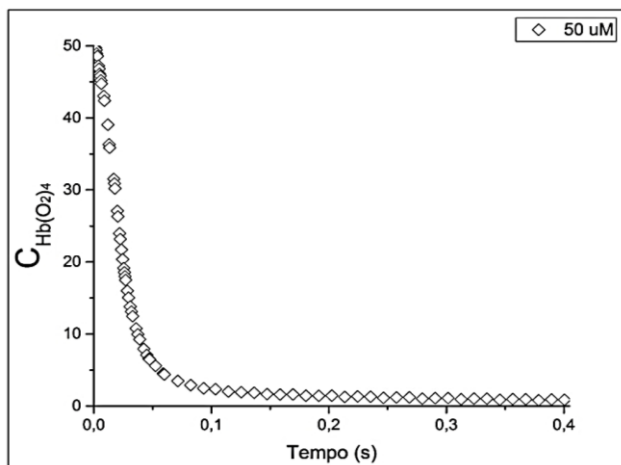
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 37 - Gráfico da concentração de 40 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 38 - Gráfico da concentração de 50 μM de oxi-Hb em função do tempo com os valores de concentração após subtração da interferência correspondente a forma desoxigenada.

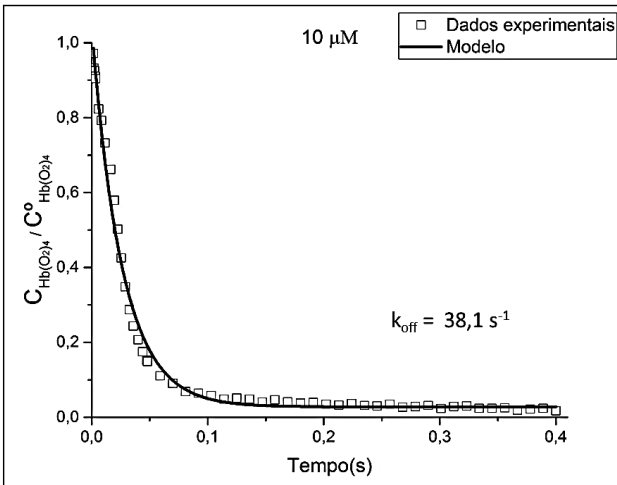


Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

4.7 CÁLCULOS DE k_{off}

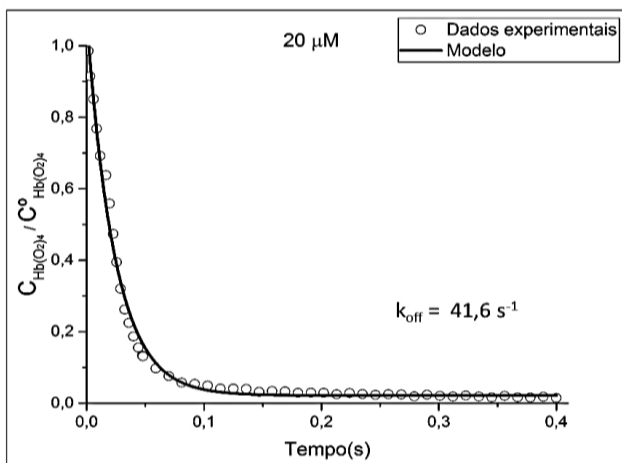
Os valores de k_{off} foram obtidos através de um modelo de ajuste não-linear realizado no software Origin® das concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 μM) utilizadas nos experimentos. As Figuras 39 a 43 representam os gráficos adimensionalizados de concentração em função do tempo com seus respectivos ajustes e valores de k_{off} . A adimensionalização das concentrações foi obtida através da divisão da concentração de oxi-Hb ($C_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}$) pela sua concentração inicial ($C_{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}^0$).

Figura 39 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 10 μM de Oxi-Hb.



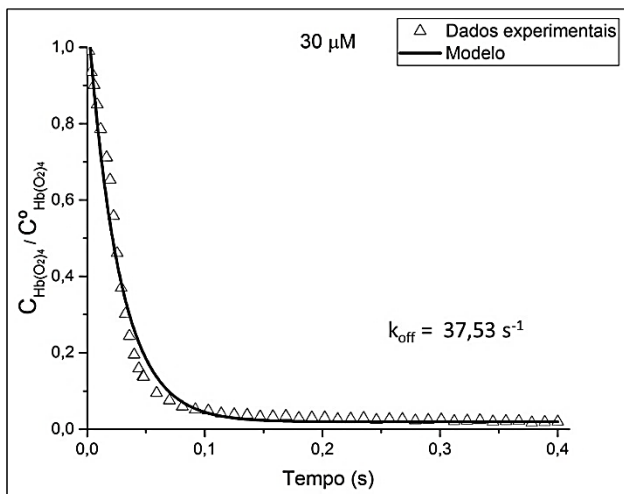
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 40 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 20 μM de Oxi-Hb.



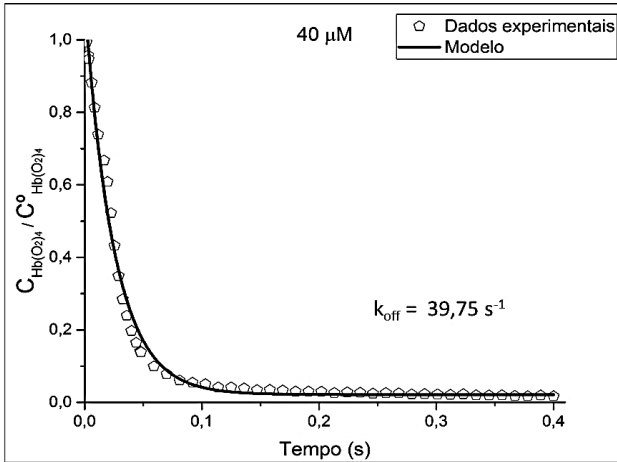
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 41 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 30 μM de Oxi-Hb.



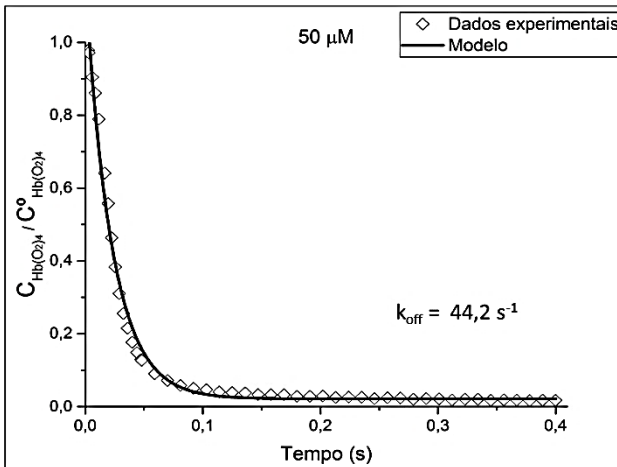
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 42 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 40 μM de Oxi-Hb.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

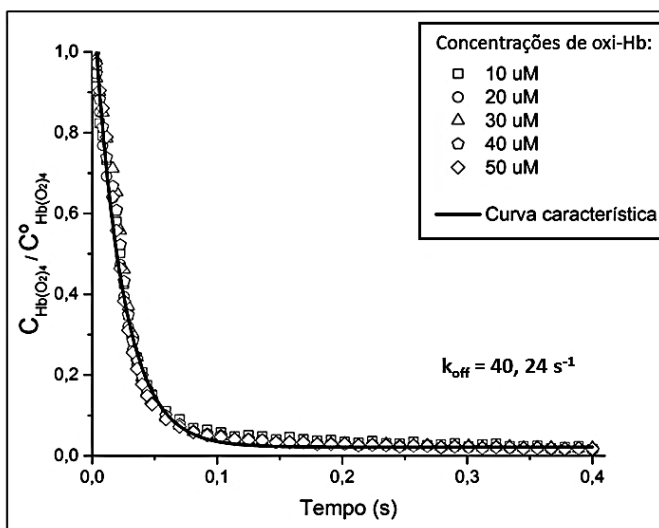
Figura 43 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo para a concentração de 50 μM de Oxi-Hb.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Com o objetivo de encontrar uma curva característica que melhor represente a cinética da reação, foi construído o gráfico da Figura 44 por meio da sobreposição de todas as curvas normalizadas das concentrações de oxi-Hb analisadas, utilizando o valor de k_{off} médio obtido, que foi de $40,24 \text{ s}^{-1}$. É possível observar que todas as curvas possuem um comportamento cinético padrão independentemente da concentração de oxi-Hb utilizada nos experimentos.

Figura 44 – Gráfico representando a curva característica para a reação de desoxigenação da oxi-Hb utilizando o valor médio de k_{off} de $40,24 \text{ s}^{-1}$.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Alguns autores obtiveram seus resultados em diferentes condições experimentais empregando o método de mistura rápida com fluxo interrompido conforme explicado abaixo:

Johnson, Adamson e Mauk (1998) utilizaram em seus experimentos de desoxigenação $20 \mu\text{M}$ de HbA_0 (oxi-hemoglobina humana) para $1,5 \text{ mg/mL}$ de DTS, tampão Tris 50 mM , pH $7,4$ e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Gelderman e colaboradores. (2010) nas mesmas condições de pH, temperatura e tampão de Johnson, Adamson e Mauk (1998) usaram $30 \mu\text{M}$ de HbA_0 (oxi-hemoglobina humana) para $1,5 \text{ mg/mL}$ de DTS.

Jia e colaboradores (2013) obtiveram sua análise experimental em tampão Tris 50 mM, pH 7,4 e temperatura de 25 °C, utilizando 30 μ M de oxi-Hb humana para 1,5 mg/mL de DTS.

Os valores de k_{off} encontrados na literatura podem ser observados na Tabela 01.

Tabela 1 - Representação da constante de dissociação (k_{off}) e do tempo morto (TM) utilizado no presente trabalho em comparação com artigos da literatura.

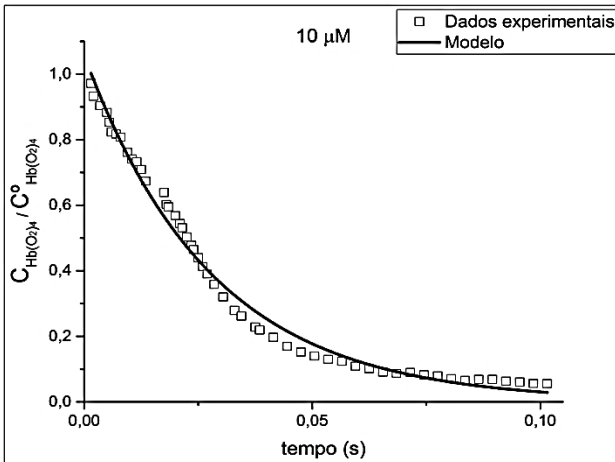
Autores	Valores de k_{off} (s^{-1})	TM (ms)
Johnson, Adamson e Mauk (1998)	34,6	1,5
Gelderman <i>et al.</i> (2010)	38 – 43	1,3
Jia <i>et al.</i> (2013)	33	1,3
Presente trabalho	40,2	0,4

Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

A diferença entre os valores encontrados na literatura e o do presente trabalho deve-se a dois motivos principais. O primeiro deles refere-se ao tempo morto. O TM do presente trabalho foi menor que os utilizados na literatura, fator esse muito importante, pois foi possível a obtenção dos dados de absorvância logo no início da reação. Tal evento contribuiu para observar que o modelo de pseudo-primeira ordem, composto de uma única constante (k_{off}), não é uma representação ideal do processo de dissociação do oxigênio com a hemoglobina, uma vez que essa reação ocorre em quatro etapas de uma forma bem mais complexa.

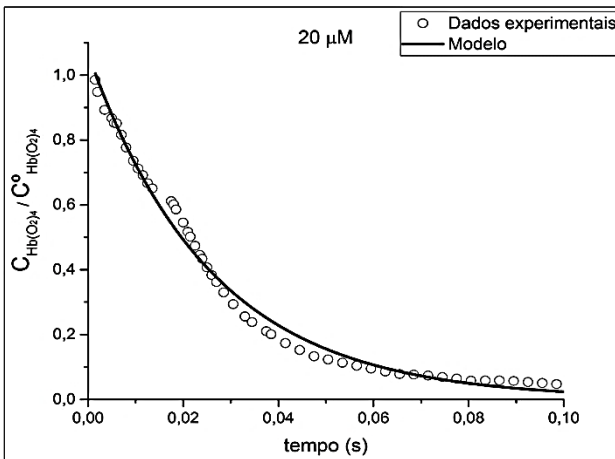
Ao analisar os resultados em um tempo menor, em torno de 0,1 segundos, pode-se notar com mais clareza que uma constante de dissociação global representada por um modelo de pseudo-primeira ordem não é o suficiente para descrever o processo num todo, sendo que o modelo não parece se ajustar muito bem a reação quando a escala de tempo é diminuída (Figuras 45 a 49).

Figura 45 – Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.



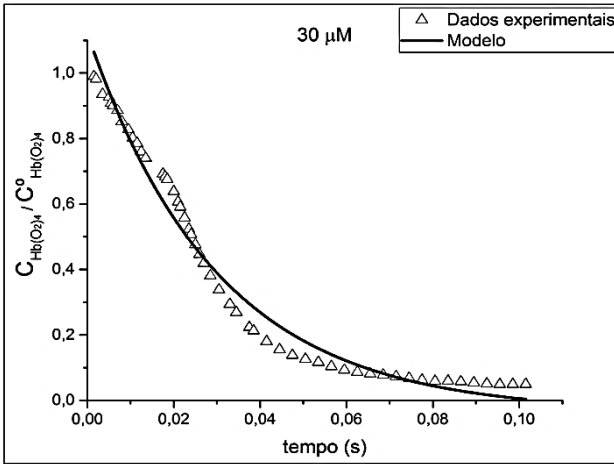
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 46 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.



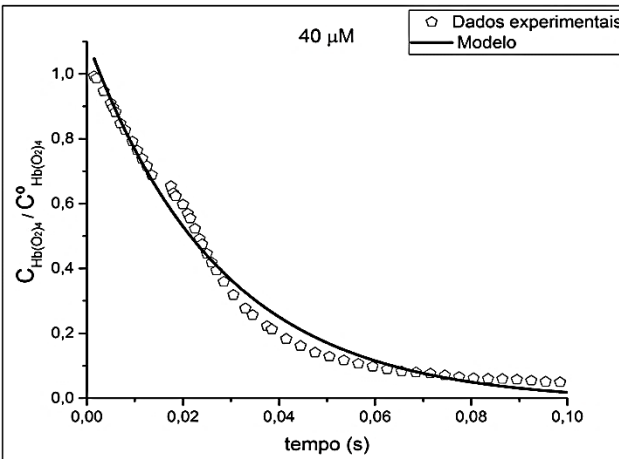
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 47 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.



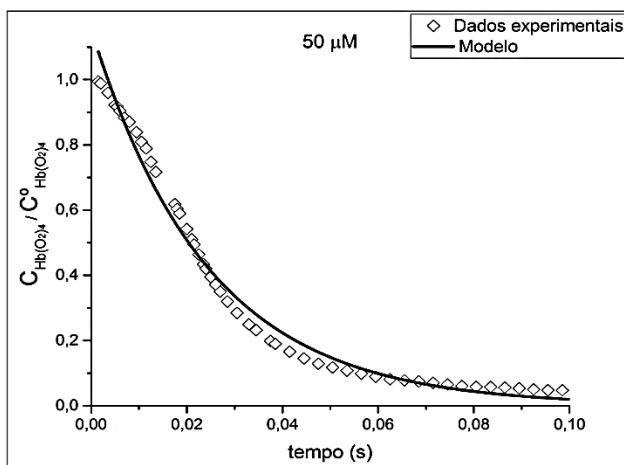
Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 48 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no tempo de 0,1 s.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

Figura 49 - Gráfico adimensional da concentração em função do tempo ajustado ao modelo no e tempo de 0,1 s.



Fonte: Desenvolvido pelo autor (2016).

O segundo aspecto é que os trabalhos presentes na literatura propõem um modelo de pseudo-primeira ordem, mas sempre trabalhando em termos de absorbância em função do tempo. Porém, valores de absorbância não podem servir como um modelo geral a ser utilizado em experimentos, pois cada equipamento emitirá um valor de absorbância específico que varia dependendo do fabricante e do caminho óptico da microcubeta. No presente trabalho, optou-se por usar valores de concentração ao invés de absorbância, metodologia essa ainda não vista na literatura até então, e que pareceu uma alternativa mais viável para validação de um modelo experimental.

5 CONCLUSÃO

A realização do presente trabalho possibilitou avaliar o papel do ditionito de sódio no processo de redução da meta-hemoglobina e também na desoxigenação da oxi-Hb pelo método de fluxo interrompido.

Foi possível observar através dos dados experimentais que a desoxigenação se trata de um processo extremamente rápido, tendo início ainda nos primeiros milésimos de segundo após o contato com o agente redutor.

O protocolo experimental desenvolvido mostrou-se eficiente para o experimento de desoxigenação. No entanto, o modelo de pseudo-primeira ordem, amplamente utilizado na literatura, não se mostrou adequado para descrever o processo como um todo, não se ajustando aos instantes iniciais da reação. pois a aproximação realizada através de uma única etapa com um k_{off} global não consegue representar uma reação que ocorre em quatro etapas distintas. Deste modo, este trabalho pode contribuir para melhor compreensão, não somente do estudo cinético avaliado, como também sinalizou importantes perspectivas para estudos futuro, como o cálculo das constantes cinéticas

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Efetuar também o procedimento de oxigenação da desoxi-Hb pelo método de fluxo interrompido.
- Propor outro modelo matemático para a reação que considere as quatro etapas de desoxigenação.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J.; KENNEDY, P. E.; MEHANNA, A. S.; PATWA, D.; WILLIAMS, F. L. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 4. Structure-activity relationships of benzyloxy and phenoxy acids. **Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 967-978, 1984.

ADAIR, G. S. The Hemoglobin System. VI. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin. **Journal Biological Chemistry**, vol. 63, p. 529-545, 1925.

ANDERSEN, S. O.; WIMBERLEY, P. D.; GÖTHGEN I.; ANDERSEN, M. S. Mathematical Model of the Hemoglobin-Oxygen Dissociation Curve of Human Blood and of the Oxygen Partial Pressure as a Function of Temperature. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 10, p.1646-1651, 1984.

ANDRADE, C. T. et al. Obtenção de hemoglobina purificada: Uso de resinas de troca aniônica para a eliminação de fosfolípídeos residuais. **Revista Brasileira Engenharia Biomédica.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 39 – 49, abril 2003.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands, ed. **Amsterdam:North-Holland Publishing Company**, , v. 21, p. 435, 1971.

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

ASSEDELFT, O. W.; ZIJLSTR, W. G. Extinction Coefficients for Use in Equations for the Spectrophotometric Analysis of Haemoglobin Mixtures, **Analytical Biochemistry**, v. 69, p. 43-48, June 1975.

BARATA, C. S.; SANTOS, T. P.; GOUVÊA, A. V.; LARENTIS, A. L.; MOREIRA, J. C.; SARCINELLI, P. N. ADAPTAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE METEMOGLOBINA COMO BIOMARCADOR DE EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO DIFLUBENZURON. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 533-537, 2015.

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**, 29, n. 05, p.1101-1105, 2006.

BAUER, D. E.; KAMRAN, S. C.; ORKIN, S. H. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β - globin disorders. **Blood**, v. 120, n. 01, 2012.

BENESCH, R.; BENESCH, R.; YU, C. I. RECIPROCAL BINDING OF OXYGEN AND DIPHOSPHOGLYCERATE BY HUMAN HEMOGLOBIN. **Biochemistry**, New York, NY, v. 59, p. 526 – 531, 1968.

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

BERGER, R. L. Some Problems Concerning Mixers and Detectors for Stopped Flow Kinetic Studies. **Biophysical Journal**, vol. 24, n.01, p. 2-20, 1978.

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

BIO-LOGIC SCIENCE INSTRUMENTS. Biokine Software User’s Manual. França. **Science Instruments**, versão 4.74, p. 1-158, 2014.

BOHR, C.; HASSELBALCH, K.; KROGH, A. Concerning a Biologically Important Relationship. The Influence of the Carbon Dioxide Content of Blood on its Oxygen Binding. **Skand Arch Physiol**, vol. 16, p. 401-412, 1904.

BOUZIRI, A; KHALDI, A; MENIF, K; BEM, J. N. Unusual cause of severe toxic methemoglobinemia in an infant: a case report. **Int J Emerg. Med**, v.7, n. 3, p. 57-59, 2010.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1 ed. **W.B. Saunders Company**, 1986.

BRITAIN, T.; SIMPSON, R. An analysis of the stopped-flow kinetics of gaseous ligand uptake and release by adult mouse erythrocytes. **Biochemical Journal**, Auckland, New Zealand, v. 260, p. 171 – 176, 1989.

BROWN, S.; SOON, Y.K. The structure and function of mammalian and plant globins. **Scientia**, v. 124, p.1-20, 2013.

BUCCI E. Thermodynamic approach to oxygen delivery in vivo by natural and artificial oxygen carriers. **Biophysical Chemistry**, vol. 142, p. 1-6, 2009.

CAMPBELL, J. M. H. et al. The relation of oxyhaemoglobin to the Co₂ of the blood. **Journal Physiology**, v. 54, n. 03, p.152-166, Aug. 23, 1920.

CHANCE, B. The accelerated flow method for rapid reactions. Part II. Design, construction and tests. I. Apparatus Construction. **Journal of the Franklin Institute**, vol. 229, p. 737–766, (see p 745), 1940.

CHUI, J.S.W; POON, W.T.; CHAN, K.C. et al. Nitrite induced methaemoglobinaemia aetiology, diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v. 60, p. 496-500, 2005.

CLARKE, Ronald J.; KHALID, Mohammed A. A. (Ed.). Pumps, Channels and Transporters: Methods of Functional Analysis: Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications. Sydney: **John Wiley & Sons**, 2015. 488 p.

CLERBAUX, T. et al. Determination de la courbe de dissociation standard de l'oxyhemoglobine du cheval et influence, sur cette courbe, de la temperature, du pH et du diphosphoglycerate. **Can J Vet Res**, v. 50, p.188-192, 1986.

CLERBAUX, T. et al. The Oxyhemoglobin Dissociation Curve in Liver Cirrhosis. **Chest Journal**, v. 129, n. 02, p.438-445, 2006.

COIN, J. T.; OLSON, J. S. The Rate of Oxygen Uptake by Human Red Blood Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Houston, Texas, v. 254, p. 1178 – 1190, February 1979.

COX, R. P.; HOLLAWAY, M. R. The Reduction of Fe(III) Myoglobin Derivates with different Ligands Attached to the Iron Atom: A Study by Rapid-Wavelength-Scanning Stopped-Flow Spectrophotometry. **European Journal of Biochemistry**, v. 74, p. 575-587, 1977.

DALZIEL, K.; O'BRIEN, J. R. P. Spectrokinetic Studies of the Reaction of Hydrogen Peroxide with Haemoglobin in Dithionite Solutions. **Biochemical Journal**, v. 67, n. 1, p. 119– 124, Fev 1957.

DALZIEL, K.; O'BRIEN, J. R. P. The Kinetics of Deoxygenation of human Haemoglobin. **Biochemical Journal**, v. 78, n. 1, p. 236 – 245, Sep 1960.

DAVIDSON, Michael W. Fundamentals of Mercury Arc Lamps. 2016. Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>>. Acesso em: 03 maio 2016.

DIXON, H. B. F.; MCINTOSH, R. Reduction of Methaemoglobin in Haemoglobin Samples using Gel Filtration for Continuous Removal of Reaction Products. **Nature**, v. 213, n. 5074, p. 399 – 400, January 1967.

DRABKIN, D.L. and AUSTIN, J.H. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 112, p. 51, 1935.

EATON, W.A.; HENRY, E.R.; HOFRICHTER, J., BETTATI, S.; VIAPPANI, C.; MOZZARELLI, A. Evolution of allosteric models for hemoglobin. **IUBMB Life**, vol. 59, p. 586–599, 2007.

FRESKGARD, Per-Ola; BERGENHEM, Nils; CARLSSON, Uno. Versatile Stopped-flow Apparatus with Adjustable Pistons. **Analytica Chimica Acta**, v. 269, p.143-148, 1992.

GEBICKA, L.; BANASIAK, E. Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobina. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 3, p. 509-513, 2009.

GEERS, Cornelia; GROS, Gerolf. Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 02, p.681-707, Apr. 2000.

GELDERMAN, M. P.; YAZER, M. H.; JIA, Y.; WOOD, F.; ALAYASH, A. I.; VOSTAL, J. G. Serial oxygen equilibrium and kinetic

measurements during RBC storage. **Transfusion Medicine**, v. 20, p. 341-345, 2010.

GEVORKIAN, S. G.; ALLAHVERDYAN, A. E.; GEVORGYAN, D. S.; HU, CHIN-KUN. Thermalinduced force release in oxyhemoglobin. **Nature**, vol. 5, p. 13064, 2015.

GIBSON, Q. H. AN APPARATUS FOR FLASH PHOTOLYSIS AND ITS APPLICATION TO THE REACTIONS OF MYOGLOBIN WITH GASES. **The Journal of Physiology**, v.134, p. 112-122, May 1956.

GIBSON, Q.H.; The kinetics of reactions between haemoglobin and gases. **Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 9, p. 1–52, 1959.

GIBSON, Q. H.; MILNES, L. Apparatus for Rapid and Sensitive Spectrofotometry. **Biochemical Journal**, 91:161, 1964.

GRAY, R. D. The effect of 2,3-Diphosphoglycerate on the Tetramer-Dimer Equilibrium of Liganded Hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, Louisville, Kentucky, v. 249, n. 09, p. 2879 – 2885, May 1974.

GUYTON, A.; HALL, J. Tratado de Fisiologia Médica, 11^a ed. **Elsevier**, 2006.

HARTRIDGE, H.; ROUGHTON. F. J. W. A Method of Measuring the Velocity of Very Rapid Chemical Reactions. **Proceedings of The Royal Society A**, v. 104, p.376, 1923.

HARVEY, R. A.; BORCHERDT, W. O. Variable Ratio Stopped-flow Mixing Device. **Anal. Chem**, v.44, n.11, p. 1926-1928, 1972.

HIGGS, D. R., ENEGEL, J. D., STAMATOYANNOPOULOS, G. **Thalassaemia. Lancet**, vol. 379, p. 373–383, 2012.

HILL, A. V. The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Hemoglobin on Its Dissociation Curves. **Physiological Society**, London, v. 40, p.IV-VII, Jan. 22, 1910.

HOLLAND, R.; SHIBATA, P. S. H.; PIIPER, J. KINETICS OF O₂ UPTAKE AND RELEASE BY RED CELLS IN STOPPED-FLOW APPARATUS: EFFECTS OF UNSTIRRED LAYER. *Respiration Physiology*, v. 59, p. 71 – 91, 1985.

HOLLAND, R.A.B.; HEZEWIJK, W.V.; ZUBZANDA, J. VELOCITY OF OXYGEN UPTAKE BY PARTLY SATURATED ADULT AND FETAL HUMAN RED CELLS. *Respiration Physiology*, vol. 29, 303-314, 1977.

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. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1672, p. 164– 173, 2004.

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

JOHNSON, M. B.; ADAMSON J. G.; MAUK, A.G. Functional Comparison of Specifically Cross-Linked Hemoglobins Biased Toward the R and T States. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 3078-3084, 1998.

JORGE, S. E. D. C. CORRELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DE VARIANTES DA HEMOGLOBINA HUMANA. Tese (Doutorado) — Unicamp, Campinas, SP, 2013.

KLOCKE, R. A. Oxygen Transport and 2,3-Diphosphoglycerate (DPG). *Chest*, v. 62, n. 5, p. 79S – 85S, November 1972.

KHORASSANI, S. M. H.; EBRAHIM, A.; MAGHSOODLOU, M. T.; SHAHRAK, M.; PRICE, D.; PAKNAHAD, A. A novel high performance stopped-flow apparatus equipped with a special constructed mixing chamber containing a plunger under inert condition with a very short dead-time to investigate very rapid reactions. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 8, n.6, p. 873-884, 2015.

KLOTZ, I. M. Hemoglobin-Oxygen equilibria: retrospective and phenomenological perspective. *Biophysical Chemistry*, v. 100, p.123–129, 2003.

LABTEST DIAGNÓSTICO S.A. Padrão de Hemoglobina. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/reagentes#>>. Acessado em 12 de junho de 2016 as 16:42.16.

LAMBETH, D.O.; PALMERS GRAHAM. The Kinetics and Mechanism of Reduction of Eletron Transfer Proteins and Other Compounds of Biological Interest by Dithionite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 17, p. 6095-6103, 1973.

MANSUR J. S. et al. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.61, n.04, p.40-44, 1986.

MCKENNA, C. E.; GUTHEIL, W. G.; SONG, W. A method for preparing analytically pure sodium dithionite. Dithionite quality and observed nitrogenase-specific activities. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1075 (1991) 109-117, Los Angeles, CA, v. 1075, n. 1, p. 109 – 117, April 1991.

MILLER, D. R.; BAEHNER, R. L. Hemolytic Anemia: metabolic defects. **Blood Diseases of Infancy and Childhood**. Sant Louis: Mosby, 1995. ISBN 978-0815161370.

MILLIKAN, G.A. Muscle Hemoglobin. **Proc R Soc London Ser B**, v.120, p.366-388, 1936.

MOREIRA, L.M.; MORAES, P.C.G.; MENDONÇA, J.P.R.F.; GUIMARÃES. L.; LYON, J.P.; AIMBIRE, F.; POLI, A.L.; IMASATO, H. Hemoglobina extracelular gigante de glossoscolex paulistus: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. **Química Nova**, vol. 34, n. 1, p. 119-130, 2011.

MULQUINEY, P. J.; KUCHEL, P. W. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations I : equations and parameter refinement. **Biochemical Journal**, Sydney, Australia, v. 342, p. 581 – 596, 1999.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. da S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Rev. Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 26, n. 1, p. 19 – 22, Maio 2004.

NASCIMENTO, T. S.; PEREIRA, R. O. L.; MELLO H. L. D.; COSTA, J. Metemoglobinemia: do Diagnóstico ao Tratamento* Methemoglobinemia: from Diagnosis to Treatment. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, n.6, p.651-664, 2008.

NIKINMMA, M. Oxygen and Carbon Dioxide transport in Vertebrate Erythrocytes: An Evolutionary Change in the role of Membrane Transport. **The Journal of Experimental Biology**, v.200, p.369–380, 1997.

PARANHOS, R. R. G.; LOPEZ-RICHARD, V.; PIZANI, P. S. Lâmpada de Hg para experimentos e demonstrações de física moderna: introdução ao efeito fotoelétrico e outros tópicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 4502.1-4502.6, Dec. 2008.

PARKHURST, L. Hemoglobin and Myoglobin Ligand Kinetics. **Annual Review Physical Chemistry**, v.30, p. 503-546, 1979.

PARSONS, L. H.; EARNSHAW, J. C.; WILTON J.; JOHNSON, K. S.; SCHUELER P. A.; MAHONEY W.; MCCAFFERTY J. Directing phage selections towards specific epitopes. **Protein Engineering**, v. 09, n. 11, p. 1043-1049, 1996.

PAULING. L. The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and its Structural Interpretation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S.A.**, v. 21, n. 4, p. 186-191, March 1935.

PERUTZ, M. F. et al. Structure of Hemoglobin. **Nature**, London, v. 185, p. 416 – 422, February 1960.

PERUTZ, M. F. REGULATION OF OXYGEN AFFINITY OF HEMOGLOBIN: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, p. 327-386, 1979.

PERUTZ, M. F. Review Lecture: Stereochemical Mechanism Of Oxygen Transport by Haemoglobin. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v.208, p. 135-162, 1980.

PERUTZ, M.F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 1-25, 1990.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. **Colombia Médica**, Colômbia, v. 36, n. 3, 07 2005.

PYE, H.; STAMATI, I.; YAHIOGLU, G., BUTT, M. A.; DEONARAIN, M. Antibody-Directed Phototherapy (ADP). **Antibodies**, v. 02, n. 02, p. 270-305, 2013.

REEVES, R. B. The Effect of Temperature on the Oxygen Equilibrium Curve of Human Blood. **Respiration Physiology**, v. 42, p.317-328, 1980.

RODRIGUES, D.F.; VIEIRA, F.C.; RODRIGUES, M.E.F. Metahemoglobinemia: etiopatogenia e quadro clínico. **Revista de Pediatria SOPERJ**, v. 12, n.1, p. 8-11, 2011.

SAMAJA, M.; WINSLOW, D. R. M. The Separate Effects of H⁺ and 2,3-DPG on the Oxygen Equilibrium Curve of Human Blood. **British Journal of Haematology**, Bethesda, Maryland, v. 41, p. 373 – 381, 1979.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood Journal**, v. 112, n. 10, p. 3927 – 3928, November, 2008.

SIGMA-ALDRICH S.A. Resina de gel filtração Sephadex G-25. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com>>. Acessado em 22 de maio de 2014 as 18:22.02.

STORZ, J. F.; MORIYAMA, H. Mechanisms of Hemoglobin Adaptation to High Altitude Hypoxia. **High altitude Medicine & Biology**, v. 09, n. 02, p. 148 – 156, 2008.

TEIXEIRA, A.DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DA REAÇÃO DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA PELO MÉTODO DE ALGORITMO GENÉTICO UTILIZANDO OS DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO STOPPED FLOW MIXER 4000/S.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of Haemoglobin. Continuing **Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 251 – 256, 09 2012.

TOSQUI, P.; COLOMBO, M. F. Uma abordagem prática de reações redox através de espectroscopia de hemoproteínas. **Revista Brasileira de ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**, São Paulo, n. 01, p. D1 – D11, Julho 2011. ISSN 2318-8790.

TSURUGA, M. et al. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin. **The Journal Of Biological Chemistry**, Japan, v. 273, n. 15, p. 8607 – 8615, abril 2010.

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

WEBER, R. E.; FAGO, A.; CAMPBELL, K. L. Enthalpic partitioning of the reduced temperature sensitivity of O₂ binding in bovine hemoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 176, p. 20 – 25, June 2014.

WEBER, R. E. et al. Lack of conventional oxygen-linked proton and anion binding sites does not impair allosteric regulation of oxygen binding in dwarf caiman hemoglobin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, n. 305, p. R300 – R312, May 2013.

WIREKO, F. C.; ABRAHAM, D. J. The Crystal state binding of dithionite to deoxy-hemoglobin. **Protein Engineering**, v. 5, n. 1, p. 3-5, 1992.

APÊNDICE A – Protocolo Experimental

A.1 MATERIAIS

- Meta-hemoglobina liofilizada da Sigma- Aldrich (H7379);
- Stopped flow mixer SFM-4000/S do fabricante Bio-Logic Sciences;
- Espectrofotômetro Spectramax Plus 384 do fabricante Molecular Devices;
- Balança analítica digital do fabricante Hadwag;
- pHmetro de bancada do fabricante Hanna;
- Agitador do fabricante Alfakit;
- Hidróxido de sódio (NaOH) da Lafan;
- Destilador de bancada do fabricante Alfakit;
- Tampão Hepes-sódico-ácido-etanosulfônico 4-2-hidroxietyl piperazina-1-sal-sódico – C₈H₁₇N₂O₄S da Vetec;
- Tampão Fosfato 20 mM pH 7.2 da Lafan;
- Ditionito de sódio (Na₂S₂O₄) da Vetec;
- Sephadex G-25 da Sigma-Aldrich;
- Membrana de diálise com poro < 64.000 Da do fabricante Spectrum Laboratories;
- Tubos falcon 10ml;
- Descarpak;
- Seringas descartáveis 10ml;
- Espátula de metal;
- Bastão de vidro do fabricante Dist;
- Béquer 50mL e 100 mL da Uniglas;
- Suporte com garra universal;
- Coluna de Cromatografia de vidro 20 x 400 mm c/ balão;
- Proveta de 1000 mL;
- Micropipeta de volume variável;
- Balões volumétricos de 5, 10, 250 e 500 mL;
- Kit de reagentes do Fabricante Labtest Diagnóstico S.A.

A.2 MÉTODOS

A.2.1 Montagem da coluna de Gel Sephadex G-25

A.2.1.1 Preparo da resina de gel Sephadex

- Pesar 15g de Sephadex G-25 em um béquer de 250 mL, para o preparo de aproximadamente 25 cm de altura de resina na coluna;
- Reidratar a Sephadex G-25 no béquer com 50-100 mL de água destilada;
- Esperar o inchamento da resina;
- Fixar a coluna verticalmente em um suporte universal, colocar um pequeno chumaço de algodão hidrofílico na sua extremidade inferior e depositar continuamente a resina (Sephadex) no interior da coluna.

A.2.2 Preparo da solução de Meta-Hb

A.2.2.1 Diluição da solução de meta-hemoglobina

- A meta-Hb humana liofilizada deve ser dissolvida conforme recomendações do fabricante Sigma-Aldrich com uma quantidade de 20 mg de meta-Hb humana para cada 1 mL de água destilada;

A.2.2.2 Passagem da meta-Hb pela coluna de purificação

- Equilibrar a coluna com uma solução tampão Hepes contendo 0,1 mL de heparina, enchendo a mesma com o dobro do volume da coluna e então se decanta o sobrenadante para iniciar o experimento, pois o menisco deverá estar junto com a resina. **É importante que a coluna não seque nunca;**
- Após a total eluição do tampão, fechar a torneira para carregar a coluna com 200 mg de ditonito de sódio (DTS) dissolvido em 2 mL de tampão;

- Acrescentar 1 mL de tampão para ajudar solução de ditionito descer pela coluna;
- Colocar a amostra de meta-Hb (10 mL) na coluna e abrir a torneira;
- Aplicar tampão HEPES (fase móvel) aos poucos até a penetração total da amostra de hemoglobina, mantendo um fluxo contínuo da fase móvel até o final da eluição;
- Coletar a solução desprezando o início e o final da amostra que desce pela coluna;

A.2.3 Preparo da Hemoglobina

A.2.3.2 Espectro de absorção (390 a 650nm)

- Após a passagem da amostra pela coluna é importante fazer uma varredura em espectrofotômetro dentro de uma faixa de 390 a 650 nm para observação dos picos de absorbância, comprovando dessa forma, a redução para a forma oxi-Hb. Esse estado conformacional possui picos no comprimento de onda de 415 nm (banda de Soret), 540 nm e 577 nm (banda Q). Se a amostra apresentar esses valores máximos de absorbância, significa que a meta-Hb foi reduzida e oxigenada (oxi-Hb). É importante lembrar que o comprimento de 415 nm será ajustado no equipamento SFM 4000/S a fim de medir o decaimento da oxigenação em relação ao tempo.

A.2.3.3 Dosagem da Oxi-Hb

- A concentração da hemoglobina foi obtida pelo método de Drabkin usando o kit de dosagem de hemoglobina Labtest. O kit é composto por um reagente de cor (ferrocianeto de potássio + cianeto de potássio + surfactante) mais um padrão de hemoglobina com concentração conhecida. O princípio desse método consiste na oxidação do Fe^{2+} do grupo heme da hemoglobina ao estado férrico (Fe^{3+}) pelo ferrocianeto (reagente de cor) formando hemiglobina (Hi) que combinada com o cianeto ionizado produz cianeto de hemoglobina (HiCN), o qual é medido em comprimento de onda de 540 nm. O procedimento realizado foi de três diluições para a amostra de hemoglobina e outras três para

o padrão que acompanha o kit. Em seis tubos Falcon (3 amostras + 3 padrões) foram acrescentados 5 mL de reagente de cor em cada um deles. Nos três frascos correspondentes as amostras foram adicionados 20 µL de hemoglobina e nos demais 20 µL do padrão de hemoglobina.

Tabela 02 – Sequência de diluições para preparo das soluções de dosagem da hemoglobina.

Padrão		Amostras	
Reagente de cor	5 mL	Reagente de cor	5 mL
Padrão	20 µL	Hemoglobina	20 µL

- Após a homogeneização de cada um dos tubos individualmente foi respeitado o tempo de cinco minutos (conforme recomendação do fabricante) para a realização da leitura no espectrofotômetro Spectramax Plus 384 acertando o zero com o reagente de cor. O cálculo da concentração deve ser feito utilizando o produto Padrão de Hemoglobina:

$$\text{Hb (g/dL)} = 10^* \times \frac{\text{Absorbância da amostra (média)}}{\text{Absorbância do padrão (média)}} \quad (12)$$

* Concentração do padrão de hemoglobina = 10g/dL.

A.2.3.5 Diluição da Hemoglobina

- Logo após a dosagem da hemoglobina é necessário pegar o valor obtido em g/dL e multiplicar pelo fator de conversão (0,6206) para obter o valor em mM conforme sistema internacional de medida.
- Preparar diluições com tampão HEPES a partir da solução mãe nas concentrações de (10, 20, 30, 40 e 50 µM).

A.2.4 Preparo da solução de ditionito de sódio

- A solução de DTS é diluída em 10 mL de tampão HEPES pH 7.4 de modo que a concentração final seja de 8,62 Mm. É importante que o pH da solução tampão seja sempre medido de modo que jamais esteja abaixo de pH 7.0, pois o DTS em meio ácido aquece e libera enxofre.