

- ⁵⁷ N. Enoki, K. Tsuzuki, S. Omura, R. Ishida e T. Matsumoto, *Chem. Lett.*, 1627 (1983).
- ⁵⁸ L. Minale e R. Riccio, *Tetr. Lett.*, 2711 (1976).
- ⁵⁹ V. Amico, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno e L. Mayol, *J.C.S. Chem. Comm.*, 1024 (1976).
- ⁶⁰ C. Ireland, D.J. Faulkner, J. Finer e J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 4664 (1976).
- ⁶¹ V. Amico, R. Currenti, G. Oriente, M. Piattelli e L. Tringali, *Phytochemistry*, 20, 848 (1981).
- ⁶² C. Tringali, M. Piattelli e G. Nicolosi, *Tetrahedron*, 40, 799 (1984).
- ⁶³ C. Tringali, G. Nicolosi, M. Piattelli e R. Rocco, *Phytochemistry*, 23, 1681 (1984).
- ⁶⁴ A.G. González, J.D. Martín, M. Norte, R. Pérez, V. Weyler, S. Rafii e J. Clardy, *Tetr. Lett.*, 24, 1075 (1983).
- ⁶⁵ K. Uomada, S. Hayasmi e J.D. Connolly, *Chem. Lett.*, 599 (1984).
- ⁶⁶ B.F. Bowden, J.C. Coll, S.J. Mitchell, G.J. Stokie e J.F. Blount, *Austr. J. Chem.*, 31, 2039 (1978).
- ⁶⁷ H.H. Sun, O.J. Mc Connell, W. Fenical, K. Hirotsu e J. Clardy, *Tetrahedron*, 37, 1237 (1981).
- ⁶⁸ P. Crews, T.E. Klein, E.R. Hogue e B.L. Myers, *J. Org. Chem.*, 47, 811 (1982).
- ⁶⁹ M. Ochi, M. Watanabe, I. Miura, M. Tanaguchi e T. Tokoroyama, *Chem. Lett.*, 1229 (1980).
- ⁷⁰ M. Ochi, M. Watanabe, M. Kido, Y. Ichikawa, I. Miura e T. Tokoroyama, *Chem. Lett.*, 1233 (1980).
- ⁷¹ M.P. Kirkup e R.E. Moore, *Phytochemistry*, 22, 2539 (1983).
- ⁷² N. Enoki, R. Ishida e T. Matsumoto, *Chem. Lett.*, 1749 (1982).
- ⁷³ J. Tanaka e T. Higa, *Chem. Lett.*, 231 (1984).
- ⁷⁴ N. Enoki, H. Shirahama, E. Osawa, S. Urano, R. Ishida e T. Matsumoto, *Chem. Lett.*, 1399 (1984).
- ⁷⁵ S.L. Midland, R.M. Wing e J.J. Sims, *J. Org. Chem.*, 48, 1906 (1983).
- ⁷⁶ M. Ishitsuka, T. Kusumi, J. Tanaka e H. Kakisawa, *Chem. Lett.*, 1517 (1982).
- ⁷⁷ K.L. Rinehart Jr., P.D. Shaw, L.S. Shield, J.B. Gloer, G.C. Harbour, M.E.S. Koker, D. Samain, R.E. Schwartz, A.A. Tymiak, D.L. Weller, G.T. Carter, M.H.G. Munro, R.G. Hughes Jr., M.E. Renis, E.B. Swynenberg, D.A. Stringfellow, J.J. Vavra, J.H. Coats, G.E. Zurenko, S.L. Kuentzel, L.H. Li, G.J. Bakus, R.C. Brusca, L.L. Craft, D.N. Young e J.L. Connor, *Pure & Applied. Chem.*, 53, 795 (1981).
- ⁷⁸ Y. Hashimoto, N. Fusetani e K. Nozawa, *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7th, 569 (1971).
- ⁷⁹ P.R. Burkholder, L.M. Burkholder e L.R. Almodovar, *Bot. Mar.*, 11, 149 (1968).
- ⁸⁰ I.S. Hornsey e D. Hide, *Br. Phycol. J.*, 9, 353 (1974).
- ⁸¹ T.J. Starr, M. Piferrer e M. Kajima, *Tex. Rep. Biol. Med.*, 24, 208 (1966).
- ⁸² M. Kashiwagi, T.R. Norton, Dept. of Pharmacology, Univ. of Hawaii, resultados não publicados, citados na referência 38.
- ⁸³ D.J. Faulkner, *Tetrahedron*, 33, 1421 (1977).
- ⁸⁴ E. Fattorusso em "Marine Natural Products", (editado por D.J. Faulkner e W. Fenical), Plenum Press, New York, 1977, p. 165.
- ⁸⁵ J.R.D. Guimarães, L.D. de Lacerda e V.L. Teixeira, *Rev. Brasil. Biol.*, 42, 553 (1982).

REVISÃO

O MÉTODO DE MARCADORES DE SPIN APLICADO A BIOQUÍMICA

Janice Rodrigues Perussi, Ana Célia Ruggiero e Marcel Tabak

*Departamento de Química e Física Molecular – Instituto de Física e Química de São Carlos – USP
CP 369 – 13.560 – São Carlos (SP)*

Recebido em 10/05/85

I. INTRODUÇÃO

A aplicação da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) exige a presença de elétrons desemparelhados no sistema em estudo. Dessa forma pode ser aplicada a metaloproteínas e metaloenzimas que contêm centros paramagnéticos assim como a radicais livres intermediários em reações bioquímicas. Como a maioria dos sistemas são diamagnéticos (ou seja não possuem elétrons desemparelhados), a aplicação de RPE pode ser estendida através da ligação covalente ou da difusão simples de um radical livre estável (marcador de spin) no sistema em estudo. Desta forma não apenas sistemas que possuem paramagnetismo in-

trínseco (metaloproteínas) mas outros sistemas podem ser estudados.

O método de marcadores de spin foi originalmente proposto por Mc Connell e col. (1) em 1965 e tem fornecido informações moleculares e função de membranas, ácidos nucleicos e outros sistemas biológicos (2).

Em princípio, qualquer espécie paramagnética (ex. Mn^{2+} , Co^{2+} , outros íons de metais de transição e lantanídeos) poderia ser um marcador de spin. Na prática, os marcadores de spin são geralmente do tipo nitróxido, ou seja, moléculas que contêm um fragmento paramagnético $N-O$. A utilidade do método de marcação com nitróxido resulta da grande sensibilidade da RPE, do fato de que amostras

opacas (como membranas) podem ser usadas, da especificidade do método, uma vez que apenas os centros paramagnéticos são detectados e da simplicidade relativa do espectro de RPE resultante.

Outra vantagem da utilização dos radicais nitróxidos, como marcadores de spin, é o fato que na aplicação em sistemas biológicos, em condições de pH e temperatura fisiológica, os radicais $N-O$ são estáveis nestas condições. Finalmente a química dos radicais nitróxidos tem se desenvolvido bastante graças a síntese de um grande número de marcadores com a finalidade de aplicação no estudo de sistemas específicos físico-químicos e bioquímicos (3,4).

II. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma forma de espectroscopia muito útil ao estudo de estruturas e dinâmicas moleculares. Pode ser aplicada a moléculas biológicas fornecendo informações a respeito de mudanças químicas e estruturais do sistema bioquímico. Pode-se estudar também mudanças conformacionais de proteínas, estrutura e reatividade de intermediários em reações que envolvem enzimas, esteroquímica e geometria de sítios de ligação de pequenas moléculas em proteínas, reações de oxi-redução e propriedades de moléculas biológicas (2,3,5,6).

A espectroscopia de absorção se baseia no fato de que a absorção de radiação por uma molécula envolve uma transição entre níveis de energia do estado fundamental para um nível excitado de maior energia (5). Para que a transição aconteça, a energia do quantum de radiação deve ser igual a diferença de energia, ΔE , entre os níveis fundamental e excitado. Esta igualdade é dada pela lei de Planck:

$$\Delta E = h\nu \quad |1|$$

onde ν é a frequência da radiação e h a constante universal de Planck.

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) se baseia na aplicação de um campo magnético estático $\vec{H}$, sob a ação do qual os níveis de energia correspondentes ao spin eletrônico se desdobram. As energias de transição em RPE correspondem desta forma, às energias de interação de um elétron com um campo magnético externo. A espectroscopia de RPE se localiza no espectro eletromagnético na região de microondas ($10^{12} - 10^{10}$) Hz.

A absorção de ressonância magnética pode somente ser observada em espécies que tem momento magnético desde que o pré-requisito é que elas possam interagir com um campo magnético. O emparelhamento dos elétrons que causa o cancelamento efetivo dos spins na ligação química faz com que os íons de metais de transição e radicais livres sejam praticamente as únicas espécies com momento magnético eletrônico. A energia de interação do momento magnético depende de sua projeção ao longo do campo magnético

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad |2|$$

onde $\vec{\mu}$ é o momento magnético eletrônico e $\vec{H}$ o campo magnético estático. O momento magnético correspondente ao spin do elétron é dado por (3):

$$\vec{\mu} = -g\beta\vec{S} \quad |3|$$

onde $\vec{S}$ é o spin eletrônico, β o magneton de Bohr e g uma constante de proporcionalidade cujo valor depende das espécies magnéticas em consideração.

Os spins eletrônicos são quantizados, só tomam certas orientações permitidas em relação ao campo magnético, cada uma correspondendo a energias distintas. A absorção de ressonância magnética corresponde a transições entre esses níveis de energia.

A aplicação do campo magnético $\vec{H}$ causa o desdobramento dos níveis de energia correspondentes ao momento magnético de spin ($\vec{S}$) (Fig. 1). No caso de spin $S = 1/2$ a projeção M_s pode ter dois valores $\pm 1/2$ correspondentes a um sistema de dois níveis de energia em presença do campo externo $\vec{H}$. Se for aplicada a energia adequada $h\nu$, a radiação eletromagnética pode induzir transições, isto é, mudanças na orientação do spin correspondente a transição de menor para maior energia ($M_s = +1/2 \rightarrow M_s = -1/2$) e assim a condição para a transição espectroscópica será dada por:

$$h\nu = g\beta H \quad |4|$$

onde h é a constante de Planck, ν a frequência de radiação e g, β, H os mesmos definidos acima.

A absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma da primeira derivada da absorção e está mostrado na fig. 1.

O fator g definido antes como fator de proporcionalidade entre o momento magnético e o spin eletrônico, especifica a posição da absorção espectral de uma espécie para-

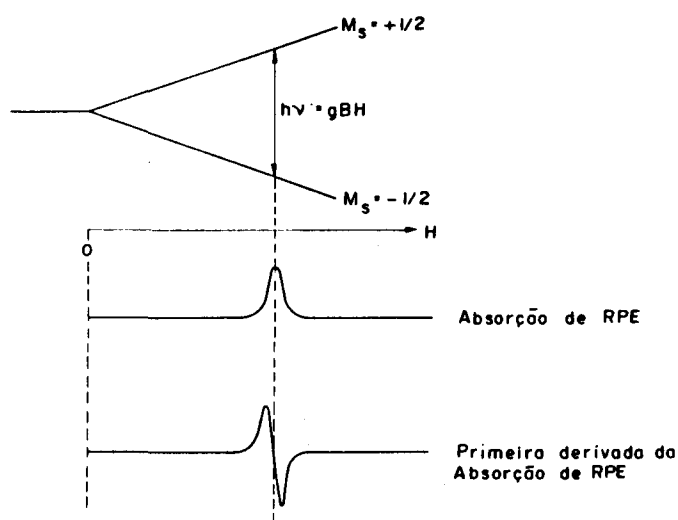


Fig. 1 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$ na presença de um campo magnético: M_s é a projeção do spin eletrônico na direção do campo magnético (5).

magnética particular e é característica desta espécie. Reescrevendo a condição de ressonância temos que:

$$g = \frac{h\nu}{\beta} \cdot \frac{1}{H} \quad |5| \quad \text{ou} \quad H = \frac{h\nu}{\beta} \cdot \frac{1}{g} \quad |6|$$

Geralmente a frequência de microondas ν é mantida fixa e o campo magnético $\vec{H}$ varia até que a condição de ressonância se cumpra. Desta forma pode-se ver que a posição da linha em termos de campo magnético define o valor de g . Isso equivale a afirmar que dado um espectro de RPE em função do campo H a posição da linha permite determinar o valor de g da amostra estudada através da relação [5].

Dois parâmetros importantes na análise dos espectros de RPE são os valores de campo nos quais as linhas são centradas, especificados pelos valores de g e o desdobramento hiperfino dessas linhas.

O desdobramento hiperfino deve-se à interação do momento magnético eletrônico com os momentos magnéticos dos núcleos vizinhos. O efeito da interação hiperfina nos níveis de energia de um elétron ($S = 1/2$) no campo magnético é mostrado na fig. (2). O número de linhas hiperfinas de um núcleo particular depende do spin nuclear (I). Para $I = 1$, são possíveis três orientações igualmente prováveis do spin nuclear em relação ao campo magnético, correspondendo a $M_I = +1, 0, -1$ (M_I é a projeção do spin nuclear na direção do campo que origina a três linhas hiperfinas no espectro de RPE (fig. 2). A interação hiperfina altera a condição de ressonância levando a que

$$h\nu = g\beta H + A \cdot M_I \quad |7|$$

onde A é a constante de desdobramento hiperfino. A posição das linhas depende de M_I , uma vez que

$$H = \frac{h\nu}{\beta} \cdot \frac{1}{g} - \frac{A}{\beta} \cdot \frac{1}{g} M_I \quad |8|$$

Em geral para um núcleo de spin I o espectro de RPE consiste de $(2I + 1)$ linhas de igual intensidade e separadas pela distância igual a A ou A/β , em unidades de campo magnético.

a) Relaxação spin-rede T_1

Até o presente momento foi considerado um quadro estático de RPE e apenas um spin eletrônico $S = 1/2$. Na verdade o campo eletromagnético induz com a mesma probabilidade transições do nível de mais baixa energia $M_S = +1/2$ para o de mais alta $M_S = -1/2$ e transições na direção oposta, isto é $M_S = -1/2 \rightarrow M_S = +1/2$. Além disso geralmente os sistemas estudados não possuem apenas um spin eletrônico, mas um número bem maior (à concentração de radical livre $10^{-4}M$, este número é $6 \times 10^{23} \times 10^{-4} = 6 \times 10^{19}$ spins). É preciso então considerar uma distribuição destes spins nos dois níveis de energia possíveis, correspondentes aos estados $M_S = \pm 1/2$, dada pela distribuição de Boltzman:

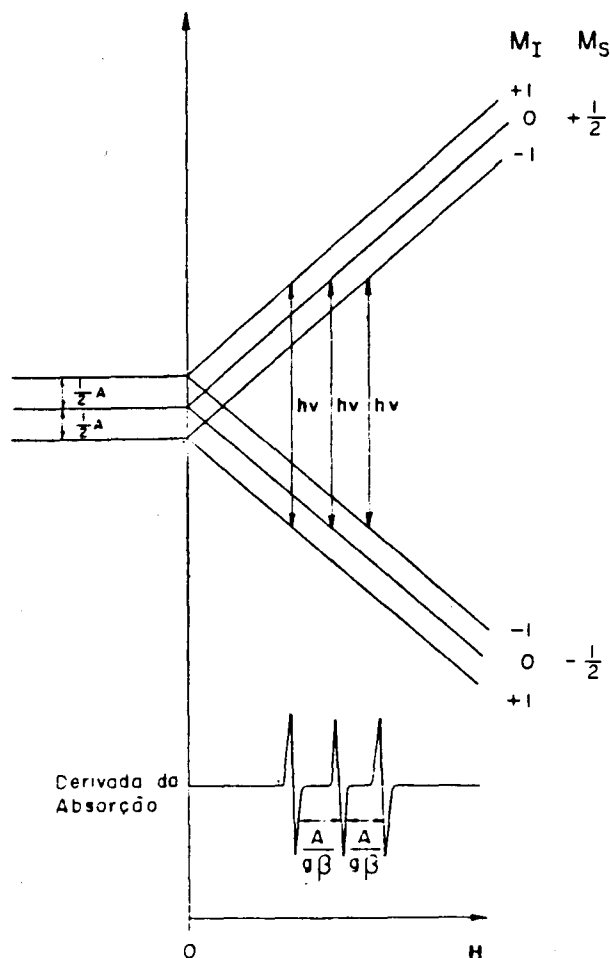


Fig. 2 Desdobramento hiperfino para spin nuclear $I = 1$ (^{14}N). São indicadas as transições de ressonância do spin eletrônico para um único elétron, $S = +1/2$. O número de linhas do desdobramento é característico do valor do spin nuclear, I ; M_I é a projeção do spin nuclear na direção do campo magnético H e M_S é a projeção do spin eletrônico. A é a constante de desdobramento hiperfino (5).

quando o sistema está em equilíbrio a uma dada temperatura,

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{+1/2}} = \exp - g\beta H/kT \quad |9|$$

Essa relação mostra que no equilíbrio existe maior número de spins no estado de menor energia ($M_S = +1/2$). Como consequência em presença do campo eletromagnético serão induzidas mais transições do tipo $M_S = +1/2 \rightarrow M_S = -1/2$ com absorção de energia pelo sistema de spins. Se não existisse nenhum mecanismo através do qual essa energia absorvida pelos spins pudesse ser dissipada (ou removida do sistema) em pouco tempo as populações dos dois níveis ficariam iguais e como a probabilidade de transição nos dois sentidos é igual, então cessaria a absorção de energia de microondas e portanto o fenômeno de RPE! Felizmente tal processo existe e é precisamente a relaxação spin-rede, através da

qual o sistema de spins libera energia para a vizinhança, rede cristalina no sólido ou moléculas vizinhas no líquido, passando então do estado $M_s = -1/2$ para $M_s = +1/2$ e essa energia é dissipada na forma de calor.

A relaxação spin-rede depende da vizinhança molecular, isto é de quão fortemente o sistema de spin está "acoplado" a rede. Em geral T_1 tem valores pequenos e portanto é curto nos sólidos enquanto que nos líquidos é relativamente longo. Isso tem dois efeitos importantes. Se T_1 é curto demais então as linhas podem tornar-se tão longas que a transição de RPE não é observada. Este caso ocorre frequentemente com metais de transição que requerem o uso de baixas temperaturas para detectar o sinal de RPE (a baixas temperaturas T_1 aumenta e as linhas ficam mais finas). Por outro lado se T_1 é longo demais então é provável que ocorra o fenômeno de saturação, isto é, as transições $M_s = +1/2 \rightarrow M_s = -1/2$ ocorrem tão rápido que o sistema não tem tempo de relaxar (T_1 é longo) e as populações dos dois estados tendem a igualar-se diminuindo o sinal de RPE. Essa saturação torna-se mais intensa com o aumento da potência de microondas. Esse efeito de alargamento pela relaxação pode ser visualizado através do princípio de incerteza de Heisenberg que diz que se um dado estado de energia tem um tempo de vida τ

$$\Delta E \cdot \tau \cong h \quad |10|$$

ou

$$h \cdot \Delta \nu \cdot \tau \cong h \quad |11|$$

e portanto

$$\Delta \nu \cong \frac{1}{\tau} \quad |12|$$

$\Delta \nu$ e ΔE são as incertezas nos valores de frequência e energia desse estado. Da condição de ressonância

$$h\nu = g\beta H \quad |4|$$

temos que

$$h \cdot \Delta \nu = g\beta \cdot \Delta H \quad |13|$$

ou

$$\Delta \nu = \frac{g\beta}{h} \cdot \Delta H \quad |14|$$

e portanto

$$\frac{g\beta}{h} \cdot \Delta H \cong \frac{1}{\tau} \quad |15|$$

É importante notar que a transição que ocorre em RPE envolve apenas a mudança da energia de interação do elétron com o campo magnético, isto é $\Delta M_s = 1$ ($M_s = \frac{+1}{2} \rightarrow$

$M_s = \frac{-1}{2}$) enquanto que a energia de interação do núcleo com o campo magnético permanece constante, isto é $\Delta M_I = 0$. Na técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) por outro lado as transições estudadas envolvem

mudanças no estado nuclear (M_I) e nesse caso também $\Delta M_I = 1$.

A interação hiperfina é muito importante em RPE uma vez que ela leva ao desdobramento das linhas correspondentes a transição eletrônica. No exemplo acima de spin nuclear $I = 1$ a transição eletrônica é desdobrada em três linhas (triplete) e é esse desdobramento que frequentemente permite identificar o núcleo vizinho do elétron desemparelhado.

A frequência típica utilizada em RPE é de 9 GHz (banda X) o que corresponde à frequência de movimentos translacionais, rotacionais ou segmentais dos sistemas estudados. Da condição de ressonância pode-se ver que o campo magnético correspondente necessário no caso de $g = 2$ é de cerca de 3000 gauss.

A análise da posição e da forma das linhas de RPE pode fornecer informações sobre a velocidade de movimento do marcador, sobre a estrutura, ordem, viscosidade e polaridade do sistema estudado, assim como de mudanças conformacionais sob a ação de agentes tais como: pH, temperatura, ions, etc.

Juntamente com o fator g e o desdobramento hiperfino na análise dos espectros de RPE é importante considerar também dois outros aspectos: o da relaxação spin-rede que origina o tempo de relaxação spin-rede T_1 e o da relaxação spin-spin que origina o tempo de relaxação spin-spin T_2 , responsável em muitos casos pela largura de linha do sinal de RPE.

$$\Delta H \cong \frac{h}{g\beta} \cdot \frac{1}{\tau} \quad |16|$$

Desta relação pode-se ver que quanto menor o tempo de vida (T_1) do estado excitado tanto maior será a largura de linha, isto é, tempos curtos levam a linhas largas.

b) Relaxação spin-spin

Os efeitos da interação magnética dipolar entre dois momentos magnéticos podem ser em geral divididos em estáticos e dinâmicos. As interações estáticas levam a linhas muito largas e é por isso que RPE em sólidos na maioria das vezes é realizado diluindo as amostras. Um dos efeitos dinâmicos da interação dipolar entre spins idênticos é o de causar mudanças de estado simultâneos dos spins. Esse processo limita o tempo de vida de um spin no estado excitado. Essa relaxação spin-spin ao contrário da relaxação spin-rede não é capaz de reduzir a saturação ou dissipar energia do sistema de spin mas contribui para o alargamento de linha devido a redução do tempo de vida do spin no estado excitado. Na maioria dos casos é o tempo de relaxação spin-spin T_2 que limita a largura de linha observada de modo que

$$\Delta \nu \cong \frac{1}{T_2} \quad |17|$$

Esta é a situação mais comum em RPE de radicais livres em solução; nesse caso a forma de linha é Lorentziana.

Assim, geralmente, a largura de linha intrínseca é determinada por T_2 e não por T_1 .

No caso de sólidos a situação é diferente e a forma de linha é geralmente Gaussiana, característica de uma distribuição aleatória de linhas superpostas.

Devido a grande sensibilidade do método de RPE, concentrações tão baixas como 10^{-6} M de espécie paramagnética podem ser detectadas em casos favoráveis. Geralmente concentrações de 5×10^{-5} – 1×10^{-4} M são usadas em estudos envolvendo radicais nitróxidos.

III. RADICAIS NITRÓXIDO

Os marcadores nitróxidos tem sido os mais usados e isso se deve a grande estabilidade destes radicais e a possibilidade de participar em reações químicas sem o envolvimento do elemento paramagnético. Além disso a química desses radicais e em especial a sua síntese obtiveram um avanço considerável nos últimos anos.

Os nitróxidos contêm como parte essencial o fragmento paramagnético $\text{N}=\text{O}$, onde o elétron desemparelhado responsável pelo paramagnetismo interage com o núcleo de nitrogênio que possui spin nuclear $I = 1$ e devido a essa interação, o espectro de RPE de um radical nitróxido em solução é um triplete com intensidades muito próximas e iguais distâncias entre as linhas (Fig. 2). O elétron desemparelhado do radical nitróxido está localizado no orbital $2p\pi$ da ligação nitrogênio-oxigênio.

A fórmula geral dos nitróxidos é a seguinte:

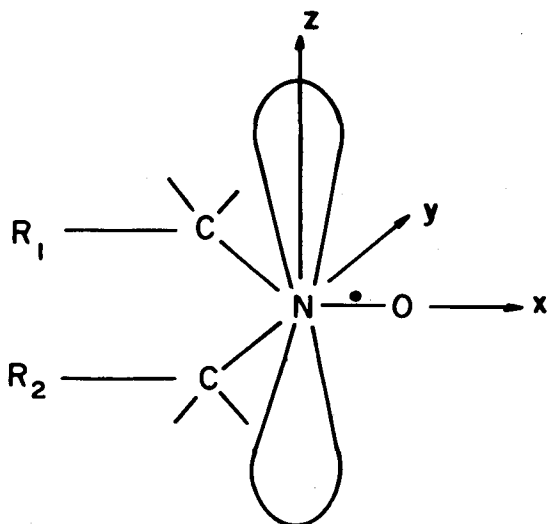


Fig. 3 Esquema do radical nitróxido. Os grupos R_1 e R_2 permitem a reação do radical sem envolver o elemento paramagnético $\text{N}=\text{O}$.

A presença de grupos metila nos carbonos vizinhos ao átomo de N, confere estabilidade adicional ao radical, permitindo a realização de estudos espectroscópicos em condições semelhantes às fisiológicas.

R_1 e R_2 são radicais convenientes para a ligação do marcador à molécula que se quer estudar formando assim os diversos marcadores de spin de radicais nitróxido (fig. 4). A

síntese desses radicais é descrita com detalhes por Berliner (2), Rozantev (3) e Rassat (4). Hoje existem mais de cem radicais que podem se ligar a proteínas, enzimas, membranas, assim como análogos paramagnéticos de moléculas de importância biológica (nucleotídeos marcadores, fosfolípidos marcadores, cofatores marcadores, etc.) (2,3,7).

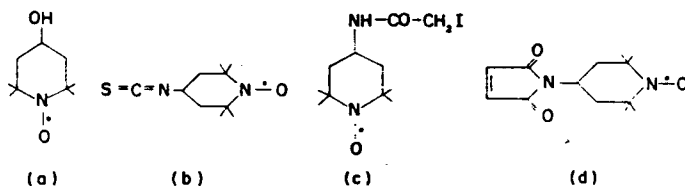


Fig. 4 Exemplos de radicais nitróxidos aplicados em bioquímica: a) tempol, b) isotiocianato, c) iodoacetamida, d) maleimida.

Anisotropia Espectral

Uma das características do espectro de RPE, é que em muitos casos a posição e o desdobramento das linhas (especificadas pelos valores de g e constante hiperfina) dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos moleculares.

A anisotropia espectral é muito importante na interpretação do espectro de íons de metais de transição e é também a base fundamental da utilidade do método de marcadores de spin (2,5).

Os efeitos do desdobramento anisotrópico e os valores de g são mais facilmente entendidos considerando o espectro de um nitróxido introduzido em um cristal. A figura 5 apresenta espectros de um marcador de spin orientado em um cristal simples. A direção do campo é paralela aos eixos principais ligados à molécula do marcador de spin, como indicado na figura. A anisotropia do espectro em relação às três direções principais é vista claramente, ambos, o desdobramento hiperfino e o fator g que define o centro dos espectros, dependem da direção do campo magnético.

A anisotropia espectral é normalmente especificada pelos três valores do fator g e da constante hiperfina obtidas nas direções paralelas aos eixos principais: A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} e g_{zz} , g_{xx} , g_{yy} . Em muitos casos o sistema molecular é simétrico axialmente e os valores principais são designados como $A_{||} = A_{zz}$, $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$ e similarmente $g_{||} = g_{zz}$, $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$. Em geral os valores dos parâmetros são: $A_{zz} = 32$ gauss, $A_{xx} = A_{yy} = 6$ gauss e $g_{zz} = 2.0027$, $g_{yy} = 2.0061$ e $g_{xx} = 2.0089$.

A anisotropia de g e A é a base do cálculo dos parâmetros de ordem em membranas.

Quando o radical está girando rapidamente em solução (por exemplo em solução aquosa) a anisotropia do espectro não aparece, pois ocorre uma média temporal e os valores de g e do desdobramento hiperfino medidos correspondem aos valores médios, isto é,

$$a_o = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad |18|$$

$$g_o = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad |19|$$

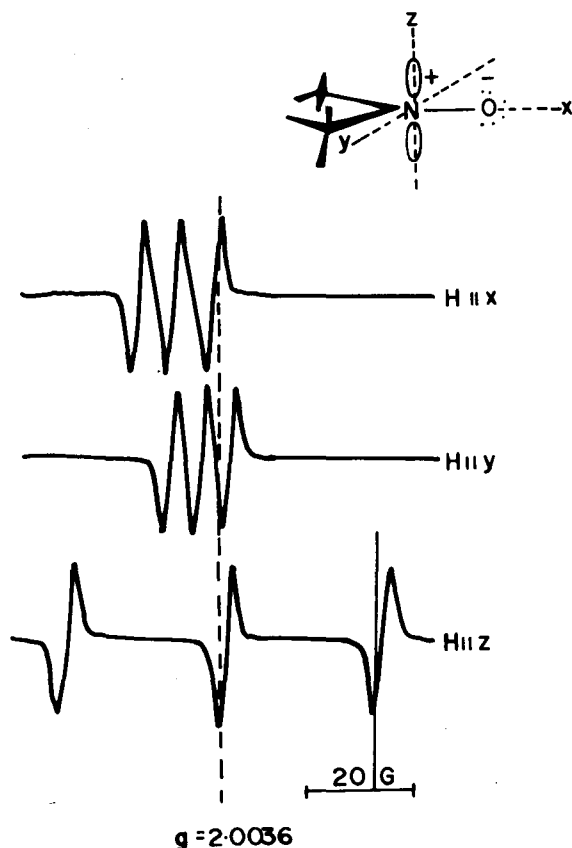


Fig. 5 Anisotropia espectral do marcador de spin terc-butil orientado em um monocristal. Os principais eixos do movimento do nitróxido estão indicados (5).

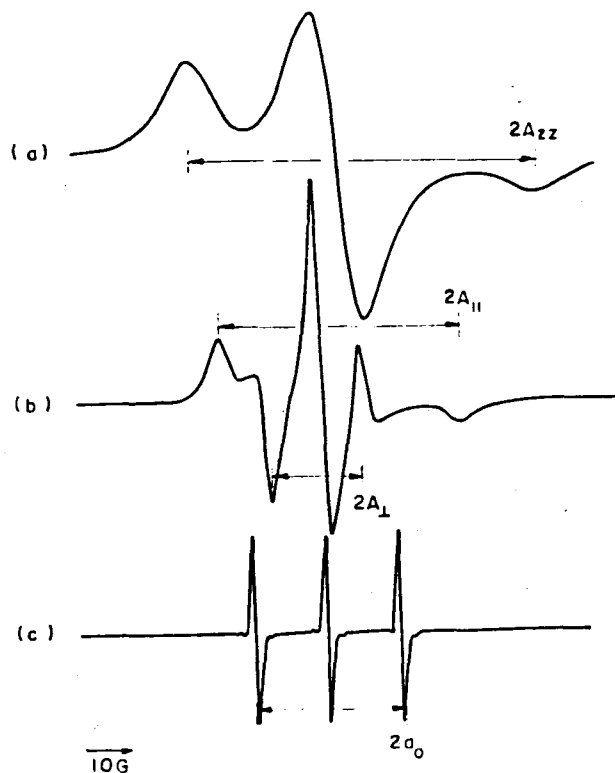


Fig. 6 Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: a) espectro de pó; b) espectro de um radical nitróxido em uma dispersão lipídica, c) espectro isotrópico, radical nitróxido em uma solução não viscosa (5).

O espectro consiste nesse caso de três linhas finas bem resolvidas equidistantes e de igual intensidade (Fig. 6 c, espectro isotrópico ou "livre").

Por outro lado, quando o marcador tem um movimento mais lento, então essa média temporal não é mais efetiva e as contribuições de diferentes orientações tomam-se importantes. No limite em que o movimento do marcador está muito lento (num líquido viscoso) ou congelado, temos que a forma do espectro é modificada, obtendo-se o espectro rígido ou "espectro de pó" (Fig. 6 (a)). O espectro de pó corresponde a soma de todas as orientações possíveis. Na fig. 7 é apresentada em forma esquemática a origem do espectro de pó correspondente a orientação randômica dos radicais. A anisotropia de g foi desprezada já que é pequena e está claro que o espectro corresponde a soma de todas as possíveis orientações do campo magnético em relação aos eixos moleculares x , y e z dos radicais individuais.

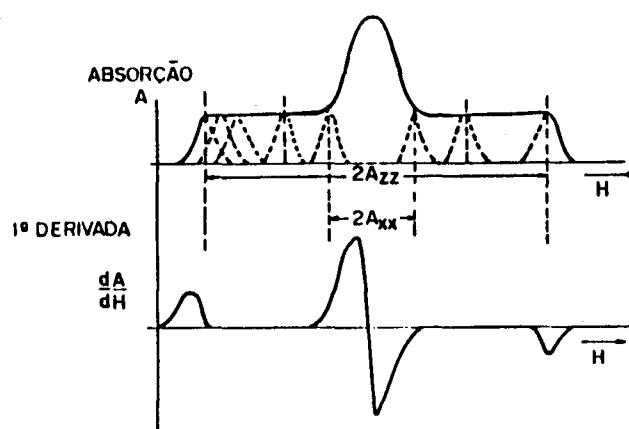


Fig. 7 Diagrama esquemático dos espectros de absorção e primeira derivada do marcador nitróxido, mostrando como a anisotropia da estrutura hiperfina do nitrogênio leva ao espectro de pó (5).

O espectro isotrópico ("livre") e o "espectro de pó" representam dois casos extremos das situações de movimento do marcador de spin encontrados na prática.

Para ambos os casos, foram desenvolvidas teorias para extrair informação sobre o movimento do marcador. Nos casos experimentais em que o movimento é intermediário, a simulação dos espectros é muito importante e tem sido usada com sucesso.

IV. APLICAÇÕES

Desta forma a análise da forma de linha permite obter informações sobre o tipo de movimento do marcador no sistema estudado e correlacionar esses dados com a estrutura do sistema em diferentes condições. O espectro do marcador pode ser sensível a mudanças que ocorrem no sistema bioquímico em diferentes condições de temperatura, pH, presença de íons, etc. Mudanças conformacionais devido à

processos bioquímicos podem modificar o movimento do marcador e desta maneira são detectados imediatamente.

As interações do elétron desemparelhado do marcador são sensíveis à sua vizinhança. A natureza hidrofóbica ou hidrofílica do meio em que o marcador se encontra pode ser determinada observando-se a variação do fator espectroscópico g . A variação do tensor hiperfino (A), medida pela variação da distância entre as linhas externas do espectro, mede a polaridade da vizinhança do marcador (8). O espectro do marcador é sensível ao tempo de correlação rotacional levando as informações sobre o movimento, mesmo anisotrópico, da vizinhança e sobre o estado físico da molécula marcada. Esse tempo de correlação depende do tamanho e forma de proteína a que está ligado o marcador. O estudo de membranas biológicas depende da liberdade rotacional do marcador no seu interior.

Experimentos utilizando marcador de spin foram os primeiros a fornecer informações diretas sobre tipos de movimentos característicos de lipídios constituintes das membranas.

IV.1. Metaloproteínas

Para compreender o funcionamento das proteínas é preciso conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína particular a nível atômico e como essa estrutura muda durante o processo funcional.

Durante 20 anos a difração de raios-X foi aplicada com sucesso para resolver a estrutura de várias proteínas sendo a hemoglobina e mioglobina os dois exemplos mais marcantes. No entanto, muitas proteínas são difíceis de serem cristalizadas, por exemplo, aquelas encontradas em membranas e outras cujo peso molecular alto apresenta problemas para o estudo de difração de raios-X. Em anos recentes outras técnicas tem sido empregadas no estudo destas proteínas e uma que se desenvolveu bastante e vale a pena mencionar é a técnica de ressonância magnética nuclear bidimensional (9). Além desta, a difração de baixo ângulo também é muito útil (10).

A RPE é um método capaz de dar informações dinâmicas bem como estruturais a nível atômico das moléculas, tendo o grande mérito de ser altamente específico. Os centros paramagnéticos em metaloproteínas estão associados com algumas ou todas as suas funções. Assim, mudanças que ocorram em tais metaloenzimas podem ser monitoradas especificamente por RPE.

Aplicações de RPE com marcadores de spin de metaloproteínas serão ilustrados utilizando a hemoglobina (Hb).

A Hb é a molécula carregadora do oxigênio do sangue e foi a primeira proteína a ser purificada. Ela foi também a primeira proteína cuja estrutura foi determinada por cristalografia de raio-X. A Hb é a ainda uma das mais importantes e abundantes proteínas dos vertebrados. O papel da Hb é ligar oxigênio molecular nos pulmões e entregá-lo aos tecidos para utilização no metabolismo; outra proteína, a mioglobina, é responsável pelo armazenamento do O_2 nos músculos voluntários, até que o oxigênio seja requisitado para a oxidação metabólica. Uma segunda tarefa da hemoglobina é trazer o dióxido de carbono (CO_2), um produto da oxidação, para os pulmões a fim de ser liberado.

O sítio ativo da Hb é o grupo heme — o pigmento responsável pela cor vermelha do sangue — constituído por um átomo de ferro (Fe^{+2}) cercado por um anel porfirínico.

A Hb possui quatro grupamentos heme sendo que cada um deles está enovelado em uma das quatro cadeias de subunidades de aminoácidos que coletivamente constituem a parte protéica da molécula, chamada globina. A estrutura das 4 cadeias da hemoglobina está diretamente relacionada com a maneira delas se comportarem na realização do seu papel fisiológico.

O íon ferroso adquire sua capacidade de ligar oxigênio molecular apenas através de sua combinação com o heme e a globina.

A hemoglobina possui seis resíduos de cisteína, sendo que dois desses são facilmente acessíveis. Os marcadores nitróxidos utilizados são reagentes específicos para esses grupos sulfidrila.

Já em 1966, McConnell (11), um dos pioneiros do método de marcador de spin, utilizou o marcador de spin maleimida para obter informações estruturais sobre a oxiHb na vizinhança do grupo sulfidrila reativo no resíduo $\beta 93$.

A ligação covalente do marcador nitróxido nesses grupos $-SH$ (na posição 93 da cadeia β) produz um sinal fortemente imobilizado no espectro de RPE (Fig. 8).

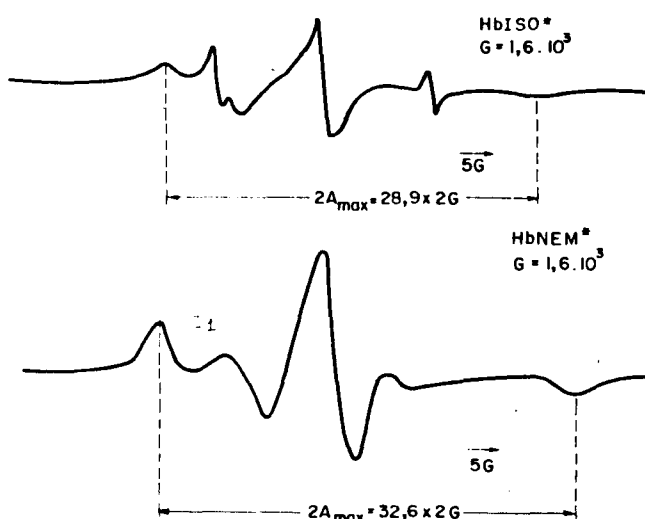


Fig. 8 Espectros de RPE da Hb marcada sob as mesmas condições (2: 1) e durante o mesmo tempo: a) HbISO*; b) HbNEM*. $2A_{max}$ é o desdobramento obtido entre as linhas em campo mais baixo e mais alto. O parâmetro G é o fator de amplificação do espectrômetro mostrado afim de comparar as intensidades dos sinais em a) e b). I_1 é a intensidade do sinal em campo baixo (13).

Na Fig. 8 os espectros de RPE da hemoglobina humana marcada com dois marcadores de spin diferentes são apresentados: com o nitróxido derivado da maleimida (NEM*) e com o nitróxido derivado do isotiocianato (ISO*) (Fig. 4). Como pode-se notar, ambos os marcadores se caracterizam pela presença de um espectro imobilizado que corresponde a mais de 90% do sinal total. No caso do isotiocia-

nato além do sinal imobilizado aparece um sinal mais "livre" que foi interpretado como devido a marcador ligado ao NH_2 -terminal da cadeia polipeptídica (12). Recentemente em um estudo cuidadoso em nosso laboratório chegou-se a conclusão que este sinal deve-se a proteína desnaturada presente em pequena porcentagem na solução (13).

A ligação do cobre em Hb humana que forma um complexo (Cu^{2+} -Hb), foi originalmente estudada pela técnica de RPE (14,15). Bemski (14) encontrou que dois íons de cobre se ligam a um tetrâmero de Hb humana em ambas as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} , produzindo um espectro de RPE de Cu^{2+} ligado à Hb.

Recentemente foi utilizada Hb marcada com radical nitróxido (13,16) para elucidar a região da cadeia β onde o sítio do Cu^{2+} está localizado. Isso foi acompanhado pela observação do efeito do Cu^{2+} na intensidade do sinal do marcador de spin.

Dos nossos estudos, observou-se que a intensidade do sinal do marcador de spin no grupo -SH $\beta 93$ mostrou um decréscimo quando o Cu^{2+} está ligado indicando que o sítio de ligação do Cu^{2+} está localizado numa região da cadeia polipeptídica próxima ao grupo sulfidril.

O bloqueio dos grupos sulfidril $\beta 93$ da Hb humana produz um decréscimo dramático na velocidade de oxidação do Cu^{2+} (17,18,19). Com base nestes resultados foi proposto (19) que o sítio de ligação do Cu^{2+} associado com a oxidação envolve o grupo sulfidril $\beta 93$. Nesse contexto é interessante que na hemoglobina humana existem dois pares de sítios de ligação do Cu^{2+} enquanto que na hemoglobina de cavalo só existe um par (17). Como o 2º sítio de ligação do Cu^{2+} (2º par) é aparentemente comum a Hb humana e Hb de cavalo e como está relacionado com a oxidação da Hb, uma caracterização deste sítio poderia contribuir na elucidação do mecanismo de oxidação da Hb pelo Cu^{2+} .

Assim foi adicionado cobre em proporções crescentes a uma amostra de Hb humana marcada com NEM* ou ISO*. Com isso a amplitude do sinal de RPE é reduzida, porém a forma do espectro praticamente não varia com a adição de até dois cobs por Hb. Com esses dados foi possível determinar a distância entre o cobre neste sítio e o marcador nitróxido (16,20) tendo sido obtida cerca de $10 \text{ \AA}$. Por isso existe uma forte interação dipolar entre o cobre e o fragmento paramagnético $\text{—N}^{\cdot}\text{O}$ do marcador ligado a cisteína $\beta 93$. Em base a análise das distâncias entre possíveis nitrogênios na cadeia polipeptídica para formar o complexo com o Cu^{2+} foi proposto o sítio de ligação do Cu^{2+} à Hb humana (16).

Através da observação da interação magnética entre o cobre e os marcadores NEM* e ISO* ligados a Hb, pode-se obter informações sobre o processo de marcação e/ou mudanças conformacionais detectadas pelo marcador, na presença de cobre.

Os resultados são mostrados nas Figuras 9 e 10.

A adição de um Cu^{2+}/Hb causa uma redução do sinal imobilizado de 40-50%, enquanto que a adição de dois Cu^{2+}/Hb reduz o sinal de 80-90%. Esses resultados sugerem que aproximadamente metade do sinal imobilizado, provém de um resíduo $\beta 93$ de uma das cadeias β enquanto que a outra metade corresponde ao outro grupo SH da outra cadeia β marcada. Desta forma a proposta de que os marcado-

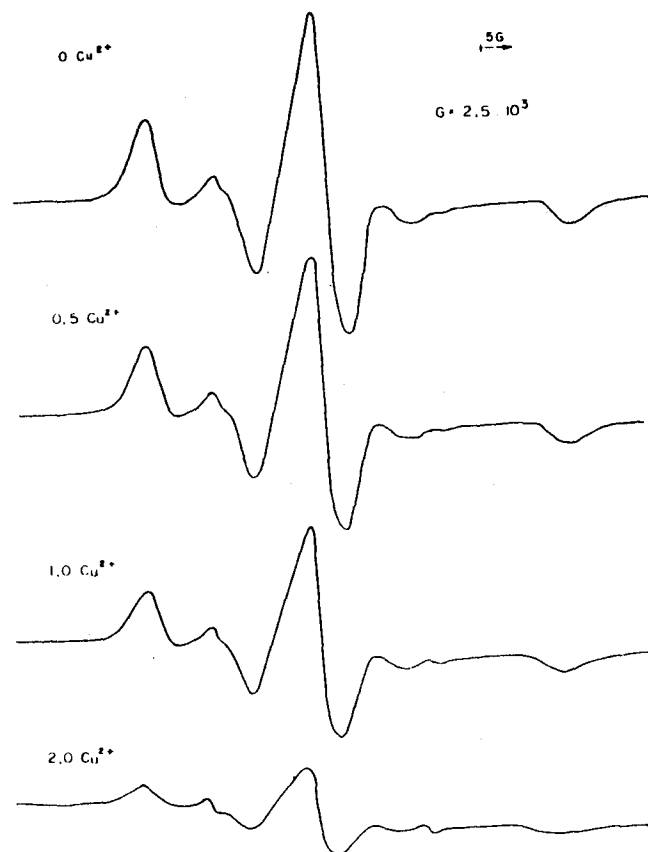


Fig. 9 Espectros de RPE típicos para uma experiência de titulação com Cu^{2+} de HbNEM*. Todos os espectros apresentados foram obtidos com amplificação de $G = 2,5 \cdot 10^3$ (13).

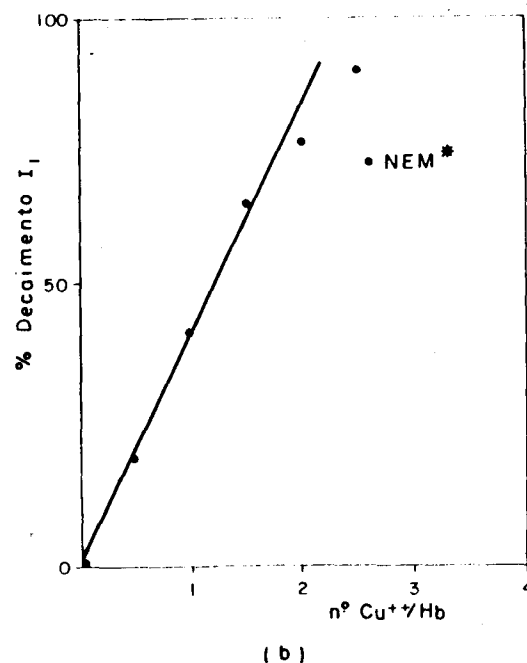


Fig. 10 Curva de decaimento para a titulação com Cu^{2+} de HbNEM*. Os pontos apresentados correspondem aos valores médios de pelo menos 3 experiências. I_1 é a intensidade do sinal em campo baixo definido na Fig. 8 (13).

res de spin ligam-se ao resíduo $\beta 93$ fica indiretamente comprovada. Além disso uma pequena fração da Hb é desnaturada devido a adição de Cu^{2+} (13).

IV.2. Membranas

As células possuem uma membrana que separa o interior (citoplasma) do meio externo. As membranas biológicas são altamente especializadas, além de se constituir em uma barreira natural, possuem sistemas refinados de trocas iônicas e moleculares capazes de manter gradientes iônicos e/ou facilitar o transporte de um número considerável de solutos através da membrana.

Uma membrana bastante estudada por várias técnicas é a membrana eritrocitária. Apesar da relativa simplicidade que envolve os métodos de obtenção e purificação ela possui uma organização bastante complexa.

A membrana eritrocitária é constituída principalmente por lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios estão dispostos em uma bicamada, em que as proteínas se inserem de maneira complexa. As proteínas formam uma estrutura, que é o citoesqueleto, que dá às hemácias a sua forma discóide, e além disso, compõe os sistemas que envolvem a entrada e saída na célula de íons e moléculas, como a glicose.

Vários tipos de proteínas já foram isoladas da membrana eritrocitária humana, cerca de 20, mas nem todas tem ainda suas funções determinadas.

As membranas não possuem paramagnetismo intrínseco e por isso a aplicação da espectroscopia de RPE ao seu estudo só é possível utilizando os marcadores de spin ou outras moléculas paramagnéticas extrínsecas. Os marcadores de spin podem se ligar as proteínas da membrana ou aos lipídeos (21,22).

Em estudos com marcadores de spin, supõe-se que o espectro de RPE do marcador (ou sonda) reproduz fielmente a estrutura e mobilidade do sistema biológico. Este deve ser o caso, quando a sonda tem uma semelhança estrutural aos componentes biológicos. Por esse motivo no estudo das membranas têm sido usados derivados nitroxídicos de ácidos graxos ou de fosfolipídios. Esses marcadores devido à sua estrutura orientam-se com suas cadeias alquílicas adjacentes, ao lado das cadeias dos fosfolipídeos e com seus grupos polares ácidos próximos dos grupos polares das moléculas lipídicas (23). A Fig. 11 ilustra esse fato para alguns nitroxídicos derivados do ácido esteárico, sendo que com esses marcadores estaremos especificamente observando os lipídios da membrana.

Utilizando diferentes marcadores de spin é possível se obter informações sobre as diferentes regiões da bicamada mais ou menos próximas a interface membrana-água (24).

De acordo com a estrutura do marcador ele apresenta um tipo de espectro característico. Na Fig. 12 (25) estão apresentados espectros de RPE na membrana eritrocitária para três marcadores de spin derivados do ácido esteárico: 5-doxil estearato, 12-doxil estearato e 16-doxil estearato. O 5-doxil estearato tem um grau menor de movimento (é mais imobilizado) do que o 12-doxil estearato que por sua vez tem menos movimento que o 16-doxil estearato.

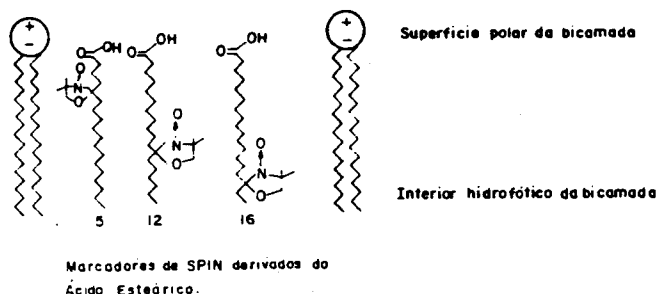


Fig. 11 Orientação de vários derivados nitroxídicos do ácido esteárico nas membranas. Os números 5, 12 e 16 indicam a distância entre o radical nitroxido e o grupo carboxílico. Os fosfolipídeos são mostrados com suas cadeias metilênicas voltadas para o interior da bicamada e a parte polar para o meio aquoso. Apenas metade da bicamada é mostrada (adaptado da ref. 5).

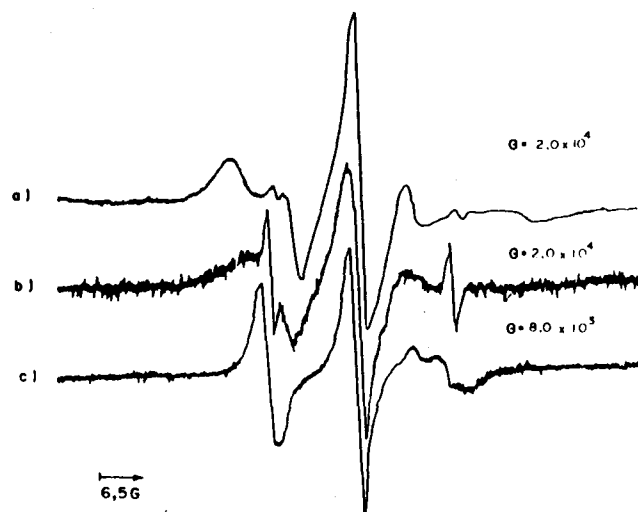


Fig. 12 Espectros de hemácias íntegras (hematócrito 50%) — marcadas por 10 min a temperatura ambiente. a) $I_{12,3}$ (5-doxil estearato); b) $I_{5,10}$ (12-doxil estearato); c) $I_{1,14}$ (16-doxil estearato). Espectros registrados a 37°C (25).

Para descrever o movimento desses marcadores o parâmetro de ordem S (5,2), é geralmente usado:

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \quad [20]$$

onde $A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$ são medidos diretamente do espectro experimental e A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os valores obtidos do espectro rígido (de pó) ou de medidas em monocristal quando o tensor hiperfino é determinado para o marcador específico.

Quando a ordem dos lipídios na membrana é grande (espectro "rígido"), então $S = 1$, enquanto que, quando o movimento molecular é "livre" (isotrópico), $S = 0$. Experimentalmente observa-se espectros entre esses dois extremos, com os valores de S variando entre 0 e 1.

Os espectros da Fig. 12 se caracterizam por um valor de S próximo a 1 para o 5-doxil estearato e próximo de 0 para o 16-doxil estearato. Daí que o maior ou menor valor do parâmetro S é geralmente correlacionado com uma menor ou maior fluidez da membrana (a fluidez neste caso aumenta com o aumento do movimento molecular o valor de S diminui).

O método de marcadores de spin, tem sido utilizado com os marcadores derivados do ácido esteárico, principalmente o 5-doxil estearato, para obter informações da fluidez dos lipídios da membrana através da medida do parâmetro de ordem S. Quanto menor o valor de S, mais fluída é a região próxima ao centro paramagnético do marcador de spin (26). A fluidez dos lipídios da membrana tem sido, extensivamente estudada nestes últimos anos, relacionando o parâmetro de ordem, ao envelhecimento dos eritrócitos.

Shega e col. (27) verificaram que o movimento dos marcadores de spin lipídicos é reduzido na membrana das células mais velhas. Os espectros são sempre mais imobilizados que os das células jovens.

Outra aplicação interessante da técnica de marcadores de spin lipídicos, é a observação da ação de diversas drogas na membrana eritrocitária, monitorada por RPE. Mudanças nos parâmetros obtidos dos espectros de RPE das membranas tratadas com drogas em relação às membranas intactas, indicam a localização das perturbações causadas pelas drogas. Em certos casos é possível detectar mudanças irreversíveis na membrana e a completa ruptura da membrana (29).

Eritrócitos Anormais

O método de marcadores de spin tem sido utilizado para detecção de mudanças na membrana citoplasmática de eritrócitos que se relacionam com algum tipo de anormalidade. Entre as anormalidades, as mais estudadas por RPE são a anemia falsiforme, distrofia muscular, talassemias e outras (29).

A anemia falsiforme é uma severa anemia hemolítica que está presente em indivíduos portadores de uma hemoglobina anormal, a HbS. Na HbS, a substituição de um aminoácido valina na posição 6 das cadeias β , por um ácido glutâmico, ocasiona a polimerização das moléculas de Hb, no interior do eritrócito. Essa polimerização ocorre em baixa tensão de oxigênio, e produz uma mudança na forma do eritrócito, de discóide para a forma de foice.

Muitos aspectos relacionados a molécula de HbS na forma polimerizada tem sido estudados, entre eles, a orientação das fibras do polímero, a influência dos fosfatos orgânicos, do pH, além do papel de drogas que possivelmente possam inibir o processo de falcização da HbS.

Em relação à membrana eritrocitária tem sido estudada a diferença entre as células normais e as falsiformes. Jones e col. (30) utilizando marcadores proteicos sugerem que a membrana da hemácia desempenha papel importante na polimerização.

Na distrofia muscular — um termo genérico que descreve uma doença caracterizada por um enfraquecimento progressivo e degeneração muscular — o aspecto mais importante estudado por marcadores de spin, é que as várias formas de

distrofia muscular estão associadas com defeitos generalizados na membrana eritrocitária. Neste caso o método de transferência de saturação (RPE não linear) tem sido muito útil (29).

A deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma doença causada por mutação genética e é associada a uma severa anemia hemolítica. A hemólise dos eritrócitos acontece na administração de determinadas drogas, como por exemplo, a primaquina, um agente antimalárico (31).

A anormalidade básica na deficiência é a diminuição na atividade da enzima G6PD em células vermelhas adultas. Nos indivíduos com deficiência de G6PD, a glutatona eritrocitária (GSH) é irreversivelmente oxidada a dissulfetos (GSSG) devido a ausência da regeneração do NADPH, que é formado na oxidação da glicose-6-fosfato. As células normais tem capacidade de reduzir o GSSG formado.

A glutatona é um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina. Quase todos os grupos sulfidril não proteicos dos eritrócitos estão na forma da glutatona. Muitas enzimas que possuem grupos sulfidrilas reativos são mantidos na sua forma reduzida, pelo menos em parte pela ação da glutatona eritrocitária (GSH). A Hb tem um grupo -SH reativo na posição $\beta 93$ que provavelmente é mantido reduzido pela glutatona. Portanto a glutatona é importante no metabolismo intraeritrocitário. Nas células deficientes em G6PD, nas quais o nível de glutatona está reduzido, os processos de oxi-redução estão alterados.

Quando da administração de drogas as células deficientes em G6PD sofrem transformações em seu interior e na membrana o que culmina com a hemólise.

Em nosso laboratório foram realizados estudos no sentido de se detectar possíveis diferenças nas membranas eritrocitárias das células deficientes em G6PD em relação às células normais.

Utilizando a técnica de RPE com marcadores de spin específicos para os lipídios da membrana ($I_{12,3}$, $I_{1,14}$ e $I_{5,10}$) e células íntegras procurou-se verificar alteração nos parâmetros obtidos dos espectros de RPE de células normais e deficientes em G6PD. Os resultados obtidos indicam que as hemácias G6PD possuem a membrana mais rígida que as células normais, e é na camada mais interna da membrana que se observa essa alteração (25). As alterações são pequenas sugerindo também que em condições normais as membranas das hemácias G6PD não são muito diferentes das normais. É interessante verificar o que ocorre quando as hemácias são submetidas a ação de drogas causadoras de hemólise.

O emprego da técnica de marcadores de spin em diferentes doenças neurológicas tem relacionado os sintomas clínicos a defeitos nos mais diferentes níveis da membrana eritrocitária. A técnica de RPE auxiliada por outros métodos, permite detectar exatamente o local da membrana onde a desordem ocorre, o que futuramente, poderá auxiliar largamente a terapia de algumas doenças.

Um outro tipo de experiência realizada visando comparar as hemácias G6PD deficientes e hemáceas normais foi em relação à redução do marcador de spin no interior do eritrócito. Notou-se anteriormente que vários marcadores de spin que penetram na hemácia são reduzidos perdendo

o seu paramagnetismo (32). Naquele trabalho notou-se que a cinética de redução dependia da carga efetiva no marcador sugerindo que o processo limitante era a permeação através da membrana, embora o mecanismo de redução permanecesse não esclarecido. Como o nível de glutatona intracelular é reduzido nas hemácias G6PD deficientes uma tentativa de comparar a redução do marcador de spin TEMPOL em hemácias normais e deficientes foi realizada afim de verificar o envolvimento da glutatona (25). A Fig. 13 mostra os gráficos de decaimento do sinal de RPE em função do tempo em ambas hemácias.

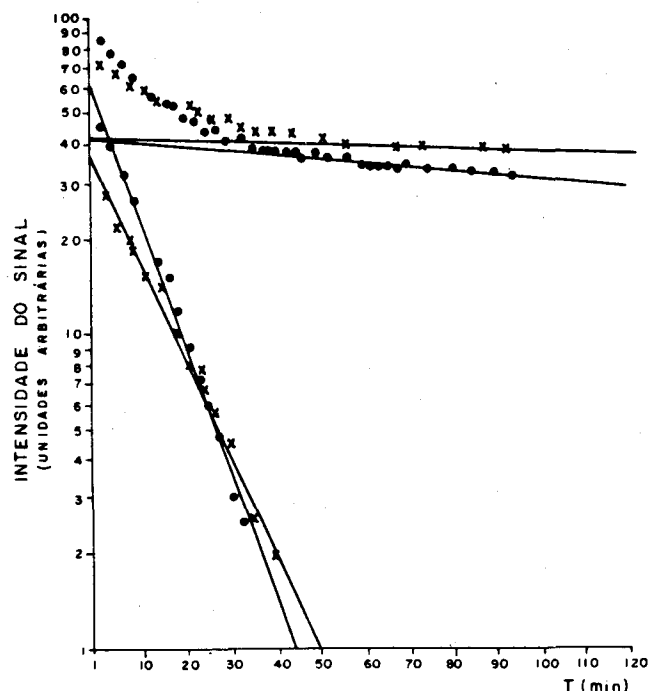


Fig. 13 Gráficos do decaimento das intensidades dos sinais do marcador TEMPOL nas hemácias normais (●●●) e deficientes em G6PD (xxx) em função do tempo. Foi tomada a intensidade do sinal correspondente a $M_1 = 0$ (linha central no espectro) (25).

Como pode-se notar não foi observada uma diferença significativa na velocidade de redução. O tratamento de hemácias com oxidantes como H_2O_2 que penetram na hemácia oxidando a Hb intracelular e possivelmente a glutatona intraeritrocitária não é capaz de abolir a redução do marcador de spin. Estes resultados embora não esclareçam o mecanismo de redução do marcador sugerem um caminho extremamente específico. No momento outras experiências estão em andamento para se tentar esclarecer este fenômeno.

CONCLUSÃO

Várias técnicas espectroscópicas são capazes de fornecer informações similares às obtidas com marcadores de spin mas a técnica de espectroscopia de RPE com marcadores de spin apresenta várias vantagens. Entre essas vantagens

podemos citar a sensibilidade, facilidade de comparação e a simplicidade das medidas, além da versatilidade da faixa de diferentes experimentos que podem ser realizados. A localização dos marcadores de spin no sistema pode geralmente ser bem definida e os espectros podem ser usados de vários modos. A mais simples informação que ele contém é a concentração dos spins, usada para seguir a incorporação do marcador às macromoléculas ou mudanças da concentração com o tempo (33). A análise da posição e forma das linhas em sistemas isotrópicos (soluções) ou anisotrópicos (cristais líquidos, membranas e sólidos) podem fornecer informações acerca do movimento do marcador, estrutura, ordem, viscosidade, e polaridade do sistema. Experimentos importantes com a técnica de marcadores de spin foram a evidência da estrutura de bicamada em certas porções das membranas biológicas, a descoberta da difusão transversa ("flip-flop") em bicamadas membrana e a medida de suas constantes de difusão e a primeira medida do tamanho de um sítio do anticorpo (1). A base teórica para análise das experiências está bem elaborada (2,7,34) e graças a isso certamente será ainda maior o número de aplicações bioquímicas desta técnica.

Referências Bibliográficas

- 1 S. Ohnishi e H.M. McConnell, J. Am. Chem. Soc., 87, 2293 (1965).
- 2 L.J. Berliner — Spin Labelling: Theory and Application, Academic Press, New York, 1976.
- 3 E.G. Rozantsev — Free Nitroxyl Radicals, Plenum Press (Trad. B.J. Hazzard) New York, 1970.
- 4 D. Bordeaux; J. Layzerowicz; R. Briere; H. Lemaire e A. Rassat, Organic Magnetic Resonance, 5, 47 (1973).
- 5 P.F. Knowles; D. Marsh e H.W.E. Rittle — Magnetic Resonance of Biomolecules — John Wiley e Sons, New York, 1976.
- 6 G.I. Likhtenstein, Spin Labelling in Molecular Biology, Plenum Press, 1976.
- 7 L.J. Berliner — Spin Labelling — Academic Press, New York, 1979.
- 8 G. Lassman; B. Ebert; A.N. Kusnetov e W. Dameran, Biochem. Biophys. Acta, 298 (1973).
- 9 W. Hoppe; W. Lohmann; H. Marrel; H. Ziegler, Biophysics, Springer — Verlag, 1983.
- 10 C.R. Cantor; P.R. Schimmel "Biophysical Chemistry", Part II, W.H. Freeman and Co, San Francisco, 1980.
- 11 S. Ohnishi; J.C.A. Boyens; H.M. McConnell — Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 56, 809 (1966).
- 12 M. Giangrande; I.W. Kim; H. Mizukami — Bioch. Biophys. Acta, 412, 187 (1975).
- 13 J.R. Perussi — "Interação de radicais nítróxidos com a molécula de hemoglobina: Um estudo por RPE". Dissertação de Mestrado apresentada no IFQSC/USP, São Carlos, 1983.
- 14 G. Bemschi; T. Arends; G. Blanc — Bioch. Biophys. Res. Comm, 35, 599 (1969).
- 15 R.L. Nagel; G. Bemschi; P. Pincus — Arch. Bioch. Biophys, 137, 428 (1970).

- ¹⁶ S.W. Louro e M. Tabak — J. Magnetic Resonance (no prelo).
- ¹⁷ J.M. Rifkind — "Copper and the Oxidation of Hemoglobins" in: M. Sigel. Metal Ions in Biological Systems, New York (Editado por M. Deccker) 1981, vol. 12, cap. 6.
- ¹⁸ J.M. Rifkind; L.D. Lauer; S.C Chiang, N.C. Li — Biochem., 15, 5337 (1976).
- ¹⁹ C.C. Winter Bourn; R.W. Carrell — Biochem. Journ., 165, 141 (1977).
- ²⁰ J.S. Leigh — J. Chem. Phys, 52, 2608 (1970).
- ²¹ F.H. Kirpatrick e H.E. Sandberg — Biochem. Biophys. Acta, 298, 209 (1973).
- ²² H.M. McConnell, B.G. McFarland — Quart. Rev. Biophys. 3, 91 (1970).
- ²³ W.L. Hubbell; H.M. McConnell — J. Amer. Soc., 93, 314 (1971).
- ²⁴ P.C. Jost; V.C. Libertini; C. Herbert; O.H. Griffith — J. Mol. Biol. 59, 77 (1971).
- ²⁵ A.C. Ruggiero — "Espectroscopia de RPE com marcador de spin aplicada ao estudo de hemáceas íntegras" — Dissertação de mestrado, IFQSC/USP, São Carlos, 1984.
- ²⁶ D.A. Butterfield; F.E. Ordaz e W.R. Markesbery, J. Geront., 37, 535 (1982).
- ²⁷ T. Shega; N. Malda; T. Suda; K. Kon e Sekiya — Biochem. Biophys. Acta., 553, 84 (1979).
- ²⁸ W.L. Hubbell; J.C. Metcalfe; S.M. Metcalfe e H.M. McConnell, Biochem. Biophys. Acta, 219, 415 (1970).
- ²⁹ D.A. Butterfield — Spin Labelling in Disease. In: Biological Magnetic Resonance, Berliner and Reuben, 1982, V. 4., Cap. 1, p. 1-78.
- ³⁰ G.L. Jones — Proc. West Pharmacol. Soc. 22, 79 (1979).
- ³¹ E. Bentter — "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency" In: "The Metabolic basis of Interisted Disease" (3rd Edition) McGraw Hill (1972) cap. 60.
- ³² A.H. Ross; H.M. McConnell — Biochem. 14, 2793, (1975).
- ³³ F.S. Axel — Biophys. Strukt Mechanism. 2, 181 (1976).
- ³⁴ J. Ruggiero Neto — "Interação de pequenas moléculas com proteínas: um estudo usando métodos convencionais e transferência de saturação de RPE", tese de doutorado, IFQSC/USP, São Carlos, 1984.

NOTA TÉCNICA

UM "STOPPED-FLOW" DE FÁCIL CONSTRUÇÃO:

Uma Improvisação que dá Certo

Matthieu Tubino

Instituto de Química — Universidade Estadual de Campinas
CP 6154 — 13081 — Campinas — SP

Recebido em 30/08/84

INTRODUÇÃO

É muito comum, ao estudar mecanismos de reações em solução, a limitação experimental imposta pelas altas velocidades dos processos químicos de interesse.

A técnica de fluxo-interrompido, ou "stopped-flow", é a que mais tem sido utilizada para a determinação de constantes de velocidade de reações rápidas. Contudo, os aparelhos comerciais são de alto custo, o que torna, esta técnica, de uso proibitivo. Em face desta situação, resolvemos construir um equipamento de custo aparente baixo, isto é, aproveitando, ao máximo, material disponível na nossa instituição. Chegamos, deste modo, ao sistema descrito neste artigo que, embora seja limitado, principalmente, pelo seu sistema de detecção, representa para nós, um primeiro passo na solução do problema.

Basicamente, o equipamento é constituído por: um espectrofotômetro Carl Zeiss modelo PM2 D, ligeiramente modificado na parte óptica; um osciloscópio Hewlett-Packard 181 A; um registrador Servogor RE 511; uma unidade de fluxo que será descrita em detalhes. Não nos preocupamos com a descrição das modificações realizadas

no espectrofotômetro, pois estas são específicas para o modelo utilizado (1).

DESCRIÇÃO GERAL

A utilização de um espectrofotômetro convencional, para a construção do "stopped-flow", foi no intuito de aproveitar os sistemas óptico e de detecção nele existentes. Sabemos, entretanto, que num aparelho deste tipo, a parte eletrônica é construída de modo a filtrar os ruídos e diminuir a flutuação do sinal. Isto implica, necessariamente, num aumento do tempo de resposta. Se num trabalho convencional tal fato não traz nenhum problema, em monitoração de mudanças rápidas de absorbância (ou transmitância) a situação pode se tornar crítica a ponto de não ser permitida a medida. Por motivos diversos não nos preocupamos em resolver imediatamente tal problema. Uma solução interessante e simples, embora parcial, é dada por Gray e Workman (2).

Na fotografia 1, tem-se uma visão geral do equipamento. O sistema de termostatização não foi incluído, para fins de