UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

José Ailton Conceição Bispo

MODELO ESTEQUIOMÉTRICO DE COOPERATIVIDADE

Dissertação apresentada ao Instituto

de Biologia para obtenção do Título

de Mestre em Biologia Funcional e

Molecular na área de Bioquímica.

Orientador : Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Bispo, José Ailton Conceição

B542m Modelo estequiométrico de cooperatividade/José Ailton Conceição Bispo. --Campinas, SP:[s.n.], 2002 f:ilus.

Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1.Proteina. 2.Hemoglobina. I. Bonafé, Carlos Francisco Sampaio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 15/03/2002

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé (Orientador)

Profa. Dra. Maria Alvina Krähenbühl

Prof. Dr. Jerson Lima da Silva

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Ao cabo de escrutar co'o mais ansioso estudo filosofia, e forro, e medicina, e tudo até a teologia ... encontro-me qual dantes; em nada me risquei do rol dos ignorantes. Mestre em artes me chamo: inculco-me Doutor: e em dez anos vai já que, intrépido impostor, aí trago em roda viva um bando de crendeiros, meus alunos ... de nada, e ignaros verdadeiros. O que só liquidei depois de tanta lida, foi que a humana insciência é lei nunca infrigida. Que frenesi! Sei mais, sei mais, isso é verdade, do que toda essa récua inchada de vaidade: lentes e bacharéis, padres e escrevedores. Já me não fazem mossa escrúpulos, terrores de diabos e inferno, atribulados sonhos e martírio sem fim dos ânimos bisonhos.

Mas, com te suplantar, fatal credulidade, que bens reais lucrei? gozo eu felicidade? Ah! nem de iludir-me e crer-me sábio. Sei que finjo espalhar luz, e nunca a espalharei que dos maus faça bons, ou torne os bons melhores; antes faço os bons maus, e os maus ainda piores. Lucro, sequer, eu próprio? Ambiciono opulência, e vivo pobre, quase à beira da indigência. Cobiço distinguir-me, enobrecer-me, e vou-me coa vil plebe confuso, à espera em vão de um nome. E chama-se isto vida! Os próprios cães da rua não quereriam dar em troco desta a sua.

> Oh minha lua cheia, oh minha doce amiga! Possas tu não mais ver em tão cruel fadiga o homem que tanta vez dos céus hás contemplado a desoras velando, em livros engolfado. Melancólica amante! a claridade tua achou-me sempre a ler. Se hoje um teu raio, ó lua, me levasse a pairar nos cumes apartados, a borboletar nos antros frequentados dos espíritos só, a saltitar liberto da científica névoa, em fundo de um deserto, à luz crepuscular que tácita derramas aos selvosos desvãos, por entre as móveis ramas! Que refrigério d'alma um banho nesse rócio não dera, amada lua, às febres do teu sócio!

Só falta recorrer às artes da magia. No espírito há poder; na voz cabe energia, que a transforma em comando. Então, consociada a palavra ao querer, talvez lhe seja dada força para arrancar com soberano império à natureza avara o íntimo mistério. Se o chego a conseguir ... que júbilo! que dita! Não precisarei mais, desde essa hora bendita, após trabalhos mil como esses que frustei, dar por certas ao mundo as coisas que não sei. Ser-me-á fácil dizer o vínculo profundo que uniu partes sem conto, e fez do todo um mundo; ver a força motriz de tanto movimento, e consignar-lhe a causa. Ah! desde esse momento em que o cerrado enigma alfim me for notório, foi-se o torpe chatim de estulto palavrório.

> Que masmorra é isto! E aqui me vou gastando neste covil infecto, abominoso, infando, lôbrega escuridade a que o celeste dia. prazer da terra toda, um raio a custo envia pelos vidros de cor em treva mascarado. Para onde quer que eu fuja o olhar do emparedado, bate nesta Babel de livros bolorentos, pastagem da polilha, informes, sonolentos, e em rumas de papéis, do tempo denegridos, caótico tropéu de abortos esquecidos, que trepa, galga, encobre, enluta, afeia, inunda, a casa desde o solho à abóboda profunda; sem falar no sem-fim de drogas, pós, essências, máquinas, que sei eu! misérias, impotências, que já me infundem tédio. E a isto se apelida o meu mundo! Isto é mundo, ou esta vida é vida?

> > Goethe

Aos meus pais,

Urani Conceição Bispo e Cícero de Souza Bispo.

Pelo imenso amor com que me impelem em busca de meus ideais.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, de Bioquímica de Plantas e ao pessoal da Secretaria de pós graduação por tornarem alegres e descontraídos os dias que antecederam a conclusão desta dissertação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Aos meus irmãos e familiares por incentivarem e possibilitarem a realização de vários sonhos e por me darem a satisfação e a felicidade de fazer parte de um grupo tão especial.

- Aos Profs. Drs. Carlos Francisco Sampaio Bonafé e Maria S. Arita Matsuura pela forma com que conduziram este trabalho e a minha orientação, despertando não apenas o meu profundo respeito e amizade mas também um senso de trabalho em grupo que veio a nos propiciar a elaboração deste modelo que aqui se apresenta como minha dissertação de mestrado. A vocês eu também gostaria de dedicá-la em honra ao profissionalismo e ao espírito científico com que vocês fazem da pesquisa uma ciência.

- À Profa. Dra. Yone Salgado, pelas discussões que auxiliaram no desenvolvimento dessa dissertação.

- À Profa. Dra. Maria Alvina Krähenbühl, pelo apoio, incentivo e clareza durante a elucidação de pontos importantes tratados aqui.

- Ao Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine, pelo seu auxílio nos diversos problemas enfrentados durante a execução deste e de outros projetos e pelas sugestões que propiciaram uma exposição mais adequada das propostas desenvolvidas nesta dissertação.

- Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop por sua imprescindível ajuda ao corrigir a versão deste modelo em inglês.
- À Juliana Helena Costa Smetana pelo grande auxílio prestado durante a correção desta dissertação e pelas sugestões que acabaram ampliando a aplicabilidade do modelo proposto.
- Aos meus amigos.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este trabalho.

A Gregório Weber. Por sua impressionante e magnífica contribuição científica.

ÍNDICE

Abreviaturas	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Objetivos	2
3. Fundamentos Teóricos	3
4. Desenvolvimento do Modelo Estequiométrico	11
5. Aplicação do Modelo Estequiométrico à dados da literatura	19
6. Aplicação do Modelo Estequiométrico à Hb de serpente	43
7. Comparação do Modelo Estequiométrico com outros Modelos de Cooperatividade	51
8. O Conceito de Cooperatividade Segundo o Modelo Estequiométrico	98
9. Conclusão e Sugestões	103
10. Referências	108
Apêndice A: Introdução à análise de sistemas termodinâmicos	. 117
Apêndice B: Descrição macroscópica de sistemas interdependentes e multiacopladores	. 141

ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
Λ_{ap}	assimetria aparente
A	energia livre de Helmholtz
α	grau de dissociação
a_i	atividade da espécie <i>i</i>
C _i	concentração molar da espécie <i>i</i> no sistema
$\Delta G^{\circ}{}_{j}$	energia livre de Gibbs padrão de reação <i>j</i>
ΔG_j	energia livre de reação <i>j</i>
E	energia total do sistema
E _c	energia cinética
E_p	energia potencial
fi	fugacidade da espécie <i>i</i>
$\mathbf{\Phi}_{j/j-1}$	número total de possíveis espécies H com j ou j-1 ligantes acoplados
G	energia livre de Gibbs total do sistema
γ _i	coeficiente de atividade da espécie <i>i</i> no sistema

γ±	coeficiente de atividade iônica
Н	entalpia
H _c	coeficiente de Hill
I _{ap}	índice de efeito aparente
K _{aj}	constante de equilíbrio para a reação j em termos da atividade a_i
$K_{D,l}$	constante de dissociação da espécie com <i>l</i> ligantes acoplados
М	número de espécies químicas presentes em solução
n	número de subunidades protéicas
μ	força iônica
$oldsymbol{ u}_{ij}$	coeficiente estequiométrico da espécie <i>i</i> na reação <i>j</i>
$oldsymbol{\mathcal{U}}_{\pm,j}$	coeficiente estequiométrico iônico médio da reação <i>j</i>
$oldsymbol{\mathcal{D}}_{wl_w}$	coeficiente estequiométrico na reação <i>l</i> de dissociação que gera o
	agregado $S_{wl_w}^{Z_{wl_w}}$, que tem n_w sítios, dos quais l_w estão ocupados pelo
	ligante, z_{wl_w} é a carga desta espécie protéica.
$\boldsymbol{v}_{D,l}$	número de prótons liberados ou capturados durante a dissociação
	da espécie proteica com <i>l</i> ligantes acoplados
Р	pressão

Q	energia de transferência
R	número de reações químicas independentes
R	constante de gases
Т	temperatura absoluta
Γι	número total de subagregados protéicos produzidos a partir da
	espécie com <i>l</i> ligantes acoplados
U	energia interna
W	trabalho realizado no sistema ou pelo sistema
<i>xi</i>	fração molar da espécie <i>i</i> em fase líquida
X_j	grau de avanço da reação <i>j</i>
\overline{X}_i	propriedade parcial molar da espécie <i>i</i>
Zion	carga da espécie iônica
Z ±,j	carga iônica média da reação <i>j</i>

RESUMO

Cooperatividade e alosterismo são fenômenos centrais na regulação de processos bioquímicos e têm sido investigados de maneira mais intensa em hemoglobinas de vertebrados. Neste trabalho é proposto o modelo estequiométrico de cooperatividade para proteínas em geral o qual se baseia na aplicação de processos multireacionais envolvendo a participação de ligantes e efetores tais como prótons. Para hemoglobinas, o grau de cooperatividade alcançado por estas proteínas é associado ao estado de protonação, ao número de ligantes acoplados, ao grau de dissociação e ao ambiente externo às mesmas. A assimetria e o índice de efeito são redefinidos e propostos como importantes parâmetros para a caracterização de sistemas cooperativos. Este modelo está em acordo com os resultados experimentais e permite previsões das propriedades das hemoglobinas humana e de serpente em diferentes condições, esta última apresentando um mecanismo de dissociação muito diferenciado. Em contraste, o clássico modelo dos dois estados e o modelo de três estados de cooperatividade mostraram algumas limitações acerca das propriedades de hemoglobinas indicando, desta forma, que suas propostas para explicar os acoplamentos cooperativos nestas proteínas baseado em transições conjuntas sem a participação do ligante pode não representar o mecanismo real de reação. Outros modelos mais recentes, que incorporam tais conceitos são, também, mostrados aqui sofrerem das mesmas limitações.

ABSTRACT

Cooperativity and allosterism are central phenomena in the regulation of biochemical pathways, and have been investigated most intensely in vertebrate hemoglobins. It is proposed in this work the stoichiometric model of cooperativity for proteins in general based on the thermodynamic application of a multiple reaction process involving participation of the ligand and effectors such as protons. In hemoglobins, the degree of cooperativity reached by a protein is related to the extent of protonation, the number of coupled ligands, the degree of dissociation and the protein environment. A redefined asymmetry and an effect index are proposed as important parameters for the characterization of the properties of mammalian and snake hemoglobins under different conditions, the latter having a very unusual pattern of dissociation. In contrast, the classic two-state and the three-state models of cooperativity show large discrepancies, even for the most elementary experimental data on the properties of hemoglobin, thus indicating that their proposed concerted transitions to explain cooperative coupling in this protein should not represent the only possible mechanism of binding. Other more recent models that incorporate such concepts are also shown here to express similar constraints to they application.

1. INTRODUÇÃO

Um dos objetivos principais no estudo de hemoglobinas (Hbs) é a busca por um melhor entendimento do fenômeno da cooperatividade. Esse fenômeno, que também está presente em passos regulatórios de vias bioquímicas, consiste em um processo no qual a ocorrência de um evento, como o acoplamento de um ligante a um determinado sítio protéico, aumenta a probabilidade de ocorrência do próximo, no caso, a probabilidade de ocorrer um segundo acoplamento aos sítios remanescentes. No caso particular de acoplamentos cooperativos a utilização de Hbs mostra-se útil devido à facilidade com que as interações proteína-ligante podem ser estudadas em condições específicas.

Com o propósito de alcançar uma precisa descrição das propriedades das proteínas em solução responsáveis pela ocorrência do caráter cooperativo muitos modelos teóricos vêm sendo propostos e testados no decorrer dos anos. Nesse contexto, foi sugerido inicialmente por Paulling (1951) um modelo relativamente simples para esse fenômeno com base no comportamento observado para o acoplamento cooperativo do oxigênio à Hb humana, uma proteína tetramérica contendo um sítio por subunidade capaz de acoplar uma molécula de oxigênio por sítio. Assim, segundo esse autor, uma possível causa para a ocorrência do fenômeno cooperativo seria devido ao fato de que na forma desoxigenada essa Hb estaria com seus sítios ativos em regiões menos susceptíveis ao acoplamento do ligante e a medida em que as moléculas de oxigênio se ligavam a cada um dos sítios protéicos modificações estruturais ocorreriam de forma a aumentar a exposição dos sítios livres remanescentes aumentando, dessa forma, a afinidade dessas Hbs pelo oxigênio distintamente para cada grau de saturação.

Um outro mecanismo proposto posteriormente com base também na molécula de Hb, Monod et al. (1965), postulava a existência de duas formas predominantes de afinidade e de estrutura para essa proteína, uma delas tensa (T) de baixa afinidade pelo ligante e a outra relaxada (*R*) de alta afinidade. A diferença fundamental entre esse modelo e aquele proposto por Paulling era dada em grande parte pelo número de espécies protéicas e pela forma com que as transições estruturais ocorriam. Enquanto o modelo de Paulling propunha a possibilidade de estados distintos de estrutura e de afinidade pelo ligante para cada estado de saturação da proteína pelo ligante, no modelo proposto por Monod e colaboradores apenas dois estados de estrutura e de afinidade eram assumidos de forma que o acoplamento do ligante não alteraria a estrutura de cada uma dessas formas mas sim a proporção entre moléculas tensas e relaxadas para cada grau de saturação. Dessa forma, postulou-se que as transições estruturais entre as formas T e R ocorreriam de maneira conjunta sem a formação de estruturas intermediárias cujo papel fosse relevante. A partir da introdução deste conceito, muitos outros modelos semelhantes, tais como a aplicação cinética desta proposta, sugerida por Henry et al. (1997), o modelo dos três estados (Edelstein, 1996), e outras versões mais anteriores (Koshland et al., 1966; Szabo and Karplus, 1972; Herzfeld and Stanley, 1974) vêm sendo sugeridos num esforço de correlacionar a estrutura, a dinâmica e a energética de agregados protéicos responsáveis pela manifestação do processo cooperativo.

Dentre as inovações apresentas por essas recentes propostas destaca-se a inclusão de novas espécies em equilíbrio capazes de modular o mecanismo cooperativo tais como prótons, ATP e BPG além de processos como o de dissociação protéica. Esse último, geralmente de difícil análise dada a alta constante de associação das subunidades protéicas, é em geral, estudado por meio de dissociação por pressão, Weber (1984) o que permite a monitorização do processo de interação proteína-proteína de maneira mais precisa por meio de técnicas espectroscópicas.

A propriedade da Hb de serpente de assumir uma forma tetramérica em presença de ATP sugeriu que essa associação molecular poderia fornecer condições para o estudo da cooperatividade, uma vez que essa Hb parece representar uma transição entre uma molécula não cooperativa para uma cooperativa (Bonafe et al., 1999). As similaridades na estrutura primária entre Hbs de várias espécies sugere ainda que tal mecanismo poderia também estar presente em um grande número de interações proteína-efetor, proteína-ligante e proteína-proteína, o que, por sua vez, torna interessante uma modelagem termodinâmica desses sistemas visando a uma compreensão conjunta do papel funcional dessas interações e do seu caráter evolutivo.

Outra característica dessas Hbs de ectotérmicos diz respeito ao fato de que o mecanismo de transporte de oxigênio nesses seres é acompanhado por uma acentuada transição dímero-tetrâmero induzida não apenas por variações na concentração de ATP livre em solução mas também pelo número de ligantes (moléculas de oxigênio) acoplados à estrutura protéica e pelo pH da solução. Transições similares observadas em Agnatha, lampréia e 'hagfish', os mais primitivos grupos de vertebrados, no qual o mecanismo de transporte de oxigênio é acompanhado de uma transição dímero-monômero, sugerem ainda que esse mecanismo de transição dímero-tetrâmero durante o transporte de oxigênio pode representar um estado intermediário de evolução para a forma tetramérica estável em ausência de ATP encontrada em vertebrados mais evoluídos. Isto, por sua vez, implicaria que, ao contrário do propostos pelos modelos atuais, tanto o ligante quanto os estados intermediários de saturação e agregação protéica poderiam ter um papel determinante não apenas na modulação do fenômeno cooperativo mas também na sua adaptação evolucionária.

Dessa forma, visando obter uma melhor descrição desses processos e de seus parâmetros de controle, é desenvolvido nessa dissertação o modelo estequiométrico (Stc) de cooperatividade. Esse modelo foi inicialmente testado para as Hbs humana e de serpente, mas pode ser estendido para proteínas em geral e para outros sistemas biológicos, cooperativos ou não. O modelo Stc descreve o comportamento de Hbs em uma larga faixa de pH e fornece previsões que explicam vários dados da literatura. Paralelamente foram realizados testes com os modelos convencionais e foram desenvolvidos programas capazes de avaliar a adequação e as limitações da atual proposta e daquelas presentes na literatura.

2. OBJETIVOS

Essa dissertação teve como objetivo analisar o mecanismo cooperativo de transporte de oxigênio em Hb de serpente, *Helicops modestus*, e quantificar os seus parâmetros de controle em meio aos modelos de transições conjuntas ("concerted models"), atualmente aceitos na literatura. Para isso, considerou-se o comportamento previsto pelos mesmos em relação ao processo de dissociação e variações de pH, o que por sua vez, propiciou uma análise mais profunda dos resultados previstos por essas propostas e a aqueles obtidos experimentalmente. Adicionalmente, objetivou-se a proposta de um novo modelo de cooperatividade que fosse capaz de se adequar não apenas a acoplamentos cooperativos mas também a sistemas diversos de interação molecular cooperativos ou não em que ocorre o efeito de ligantes, efetores ou mesmo de transições não conjuntas. Esse modelo foi denominado de modelo estequiométrico de cooperatividade (Stc), pois considera a participação de ligantes e efetores em termos de suas proporções estequiometricamente definidas, ampliando dessa forma

sua aplicabilidade não apenas para Hbs, mas também para outros sistemas biológicos diversos através do desenvolvimento de uma metodologia de análise termodinâmica capaz de correlacionar a ação do meio externo à proteína nesses processos. Desde que as modernas versões do modelo de dois estados dependem da validade do mesmo, a presente discussão poderia ficar restrita à demonstração das limitações da proposta original. Para isso, é mostrada de maneira extensiva as divergências entre esse modelo e os dados experimentais; entretanto, essas novas versões são incluídas de maneira ilustrativa em meio a uma análise crítica de suas consequências.

De maneira geral, objetivou-se nessa dissertação

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

O modelo Stc foi desenvolvido com base nos princípios da termodinâmica clássica estendida à mecânica estatística. Dessa forma, para uma sistema multirreacional consistindo de M espécies químicas, no qual \Re reações independentes ocorrem em fase única com a participação de íons (esses procedimentos formais provenientes da termodinâmica clássica são apresentados de forma resumida no Apêndice A), a forma derivada da equação de Gibbs-Duhem a temperatura e pressão constantes é:

$$dG = \sum_{j=1}^{\Re} \left[\Delta G_j^o + RT \ln \left(\prod_{i=1}^{M} (x_i \gamma_i)^{v_{ij}} \right) \right] dX_j$$
(1)

onde *G* é a energia livre de Gibbs total do sistema, ΔG°_{j} é a energia livre de Gibbs padrão da reação *j*, *R* a constante dos gases, *T* é a temperatura absoluta, *x_i* é a fração molar da espécie *i* e γ_{i} é o coeficiente de atividade dessa espécie. O coeficiente estequiométrico da espécie *i* na

reação j, v_{ij} , é positivo para produtos, negativo para reagentes e igual a zero quando essa espécie não toma parte na reação $j \in X_j$ é o grau de avanço da reação j. A concentração molar da espécie i no sistema num dado tempo t, C_i , pode ser determinada usando-se a seguinte relação

$$C_i = C_{i,0} + \sum_{j=1}^{\Re} v_{ij} X_j \qquad \Rightarrow \qquad dC_i = \sum_{j=1}^{\Re} v_{ij} dX_j$$
(2)

onde $C_{i,0}$ é a concentração inicial da espécie *i*.

Aqui expressa-se a concentração das espécies em solução por meio do grau de avanço de reação visando a obter melhor correlação entre a concentração inicial de proteína presente na solução estoque e as condições iniciais nas quais os experimentos são feitos. Assim, se uma solução estoque é mantida em determinado pH, temperatura e concentração de proteína, de tal maneira que haja virtualmente apenas uma dada espécie presente, a distribuição inicial de espécies em outras condições nas quais os experimentos serão feitos pode ser determinada usando a Eq. 2 para as situações de equilíbrio ou cinética. Isso, por sua vez conduzirá a resultados mais precisos do que aqueles obtidos por meio de polinômios de acoplamento, Edelstein e Edsall (1986), onde uma correlação direta da concentração inicial de uma dada espécie protéica nessa solução estoque em equilíbrio e aquela presente em outras condições de equilíbrio nos quais os experimentos são feitos é utilizada e assumida igual a um. A condição de equilíbrio químico para esse sistema é que dG = 0 para todas as variações consistentes com a estequiometria de reação a T, P e massa total constantes. Isso implica que para cada reação independente j, o termo entre colchetes na Eq. 1 deve também ser igual a zero, tal que

$$ln\left(\prod_{i=1}^{M}\left(x_{i}\gamma_{i}\right)^{\upsilon_{ij}}\right) = -\frac{\Delta G_{j}^{o}}{RT}$$

Dessa forma, a constante de equilíbrio, K_{aj} , para a reação j em termos da atividade a_i de todas as espécies em solução que tomam parte nesta reação pode ser definida pela relação

$$K_{aj} = \prod_{i=1}^{M} (x_i \gamma_i)^{v_{ij}} = \prod_{i=1}^{M} a_i^{v_{ij}} \qquad \Rightarrow \qquad \ln(K_{aj}) = -\frac{\Delta G_j^o}{RT}$$
(3)

Essa constante é usualmente referida em termos de uma razão entre as concentrações de equilíbrio. Assim, considerando que γ_i para solventes pode ser considerado igual a um e que a energia livre de Gibbs parcial molar de ânions e cátions não pode ser medida separadamente, apenas o coeficiente de atividade iônica γ_{\pm} é utilizado. Portanto, tomando $x_i = C_i/C_t$ e

$$\gamma_{\pm}^{v_{\pm,j}} = \prod_{ions} (\gamma_{ion})^{v_{ion,j}}$$

onde C_t é a concentração total, obtém-se:

$$K_{j} = \prod_{i=1}^{M} C_{i}^{v_{ij}} = K_{aj} \gamma_{\pm}^{-v_{\pm,j}} C_{t}^{\Sigma^{v_{ij}}}$$

$$\Rightarrow \quad \ln(K_{j}) = -\frac{\Delta G_{j}^{o} + RT \ln(\gamma_{\pm}^{v_{\pm,j}}) - RT \ln(C_{t}^{\Sigma^{v_{ij}}})}{RT} = -\frac{\Delta G_{j}}{RT}$$
(4)

tal que $v_{\pm,j} = \sum_{ions} v_{ion,j}$

Aqui, ΔG_j é a energia livre de reação j e $v_{\pm,j}$ é a soma dos coeficientes estequiométricos $(v_{ion,j})$ das espécies iônicas envolvidas na reação j.

A dificuldade com esta descrição em uma solução de eletrólitos é que as propriedades das espécies em solução dependerão muito de interações com as moléculas do solvente e com partículas carregadas, tais como prótons, interagindo mediante forças coulombianas, que são de alcance muito maior. Consequentemente, γ_{\pm} é significativamente diferente de um, mesmo para concentrações muito baixas de eletrólitos. Debye e Hückel deduziram uma expressão, usualmente referida por 'Debye-Hückel limiting law' (Sandler, 1999), para explicar a dependência de γ_{\pm} em relação à concentrações de eletrólitos em condições de baixa força iônica, tal que

$$\Delta G_{j} = -RTln \left(\prod_{i=1}^{M} (C_{i})^{v_{ij}} \right) = \Delta G_{j}^{o} - v_{\pm,j} |z_{\pm,j}| \alpha \sqrt{\mu} RT - RTln(C_{t}^{\sum v_{ij}})$$

$$e \quad z_{\pm,j} = \prod_{ions} z_{ion,j}$$
(5)

Aqui, $|z_{\pm j}|$ é o valor absoluto do produto das valências de cada íon $(z_{ion, j})$ sobre todas as espécies iônicas envolvidas na reação j, α é um termo que depende do solvente e da temperatura e μ é a força iônica definida como:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{ions} z_{ion}^2 C_{ion}$$
(6)

Esse somatório é sobre todos os íons em solução, de forma que C_{ion} é a concentração molar da espécie iônica com carga z_{ion} num dado pH. Segue-se, dessa descrição, que um aumento na força iônica pode modificar distintamente cada constante de equilíbrio, e a presença de íons

que são comuns a mais de uma reação pode impor algumas restrições a tais modificações. Esse fenômeno é normalmente referido por *efeito do íon comum* e está predominantemente presente em reações bioquímicas que envolvem a participação de prótons. Para altas concentrações de íons, foram obtidas outras formulações com ênfase na mecânica estatística que podem ser prontamente aplicadas (Berry et al., 2000).

Com as relações anteriores definidas, é possível agora, descrever o modelo Stc para sistemas cooperativos considerando uma proteína P com n subunidades contendo um sítio por subunidade capaz de acoplar um ligante específico L. Neste modelo, o acoplamento do ligante ao sítio proteico pode resultar em mudanças na estrutura quaternária as quais podem simultaneamente envolver a captação ou a perda de prótons ou de outros efetores, de maneira a estabilizar a nova conformação protéica.

Para o caso geral no qual cada isômero obtido por meio da combinação de um mesmo número de ligantes aos sítios protéicos define uma estrutura quaternária média e distinta, o número total de estruturas possíveis é 2^n , que corresponde a soma de todas as estruturas possíveis para cada estado de saturação e disposição dos ligantes nesses sítios, o que, por sua vez, pode produzir um número de estados de afinidade igual a 2^n –1, quando cada uma das possíveis combinações do mesmo número de ligantes aos sítios proteicos conduzir a uma distinta afinidade dos sítios livres entre cada isômero mas igual para todas subunidades isentas de ligantes e presentes na mesma molécula. Uma descrição detalhada acerca da natureza dessas considerações é apresentada no Apêndice B. Se não há uma diferença significativa na afinidade das subunidades livres entre isômeros com mesmo número de ligante(s) acoplado(s) e na estrutura de cada forma isomérica resultante dessas diferentes combinações, o número total de possíveis estruturas e estados de afinidade pode ser reduzido para n+1 e n, respectivamente. Assume-se então que cada espécie protéica P_l (onde *l* designa o número de sítios ocupados por ligantes e l = 0, 1, 2, ..., n) existe em um estado conformacional médio no qual pequenas variações estruturais são permitidas, e que cada uma das possíveis espécies em solução pode competir pelo ligante livre em solução com diferentes afinidades e fatores de probabilidade. Essa primeira consideração baseia-se no fato de que, quando em contato com as moléculas de solvente, a estrutura protéica determinada por cristalografia ou qualquer outro método pode se tornar suscetível a pequenas flutuações para cada estado de saturação pelo ligante ou de agregação. Considerando essas situações, propõem-se aqui que as reações envolvidas durante o acoplamento do ligante podem ser descritas concomitante com a participação de prótons nesse processo da seguinte maneira:

$$P_l^{Z_l} + L \xleftarrow{K_j} P_{l+1}^{Z_{l+1}} + v_j H^+$$
(7)

onde $j = 1, 2, ..., n, Z_l$ é a carga da proteína quando *l* dos seus sítios estão ocupados por ligantes em um dado pH, K_j é a constante de equilíbrio de formação da espécie com *j* ligantes acoplados e v_j é o coeficiente estequiométrico da espécie H^+ na reação *j* em um dado pH: o sinal numérico deste último depende da liberação ou captação de prótons, sendo positivo no primeiro caso e negativo no segundo. Desde de que se está considerando que as espécies protéicas em solução estão em um estado médio de conformação, esse último parâmetro tem da mesma forma um caráter médio. A inclusão de outros efetores pode ser feita de maneira análoga considerando-se a respectiva estequiometria desse novo efetor em cada reação.

O processo de dissociação segue o mesmo princípio e pode ser expresso, segundo a presente proposta, pela seguinte relação de equilíbrio:

$$P_l^{Z_l} \xleftarrow{K_{D,l}}{\longrightarrow} \sum_{w=1}^{\Gamma_l} v_{wl_w} \cdot S_{wl_w}^{Z_{wl_w}} + v_{D,l} \cdot H^+$$

$$\tag{8}$$

onde $K_{D,l}$ é a constante de dissociação da espécie com *l* ligantes acoplados, Γ_l é o número total de subagregados protéicos produzidos a partir dessa espécie, v_{wl_w} é o coeficiente estequiométrico na reação *l* de dissociação que produz o agregado w ($S_{wl_w}^{Z_{wl_w}}$), que tem n_w sítios, dos quais l_w estão ocupados pelo ligante, z_{wl_w} é a carga dessa espécie protéica num dado pH e $v_{D,l}$ está relacionado com o número médio de prótons liberados ou capturados durante o processo de dissociação da espécie proteica em questão. Note que $\sum_{w=1}^{\Gamma_l} v_{wl_w}$ $n_w = n$ e $\sum_{w=1}^{\Gamma_l} v_{wl_w} \cdot l_w = l$.

Aplicando a Eq. 5 nas Eqs. 7 e 8 e separando o termo referente aos prótons, obtém-se:

$$\Delta G_{j} = -RT \ln \left(\frac{C_{P_{l+1}^{Z_{l+1}}}}{C_{P_{l}^{Z_{l}}} C_{L}} \right) - RT \ln \left(C_{H^{+}} \right)^{\upsilon_{j}} = -RT \ln \left(\frac{C_{P_{l+1}^{Z_{l+1}}}}{C_{P_{l}^{Z_{l}}} C_{L}} \right) + 2,303 \upsilon_{j} RTpH$$
(9)

e

$$\Delta G_{D,l} = -RT ln \left(\frac{\prod_{w=1}^{\Gamma_{l}} (C_{S_{wl_{w}}^{Z_{wl_{w}}}})^{v_{wl_{w}}}}{C_{P_{l}^{Z_{l}}}} \right) - RT ln (C_{H^{+}})^{v_{D,l}} = -RT ln \left(\frac{\prod_{w=1}^{\Gamma_{l}} (C_{S_{wl_{w}}^{Z_{wl_{w}}}})^{v_{wl_{w}}}}{C_{P_{l}^{Z_{l}}}} \right) + 2,303 v_{D,j} RT pH$$
(10)

Para simplificar a notação e observar o comportamento aparente expresso por meio de mudanças no pH da solução, as seguintes definições são utilizadas

$$\Delta G'_j = \Delta G_j - 2,303 \upsilon_j RT pH \tag{11}$$

$$\Delta G_{D,l}^{'} = \Delta G_{D,l} - 2,303 v_{D,l} RT pH$$
(12)

O sobrescrito (') indica essas energias livres de Gibbs são dependentes do pH. As respectivas constantes de equilíbrio aparente, as quais incluem a concentração de prótons, são

$$K_{j}^{'} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{j}^{'}}{RT}\right) = \frac{C_{P_{l+1}^{Z_{l+1}}}}{C_{P_{l}^{Z_{l}}}C_{L}}$$
(13)

e

$$K_{D,l} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{D,l}}{RT}\right) = \frac{\prod_{w=1}^{l_{1}} (C_{s_{wl_{w}}^{Z_{wl_{w}}}})^{\nu_{wl_{w}}}}{C_{p_{l}^{Z_{l}}}}$$
(14)

Quando uma dada proteína pode se combinar com um número determinado de ligantes em diferentes maneiras, é necessário incluir considerações estatísticas de forma a se expressarem tais constantes em termos de suas respectivas concentrações intrínsecas de sítios. Isso ocorre devido ao fato de que não são considerados todos os possíveis isômeros envolvidos nesse tipo de equilíbrio, o que corresponde às diferentes maneiras pelas quais esses ligantes podem combinar com os distintos sítios. Embora tenha sido assumido que esses isômeros possuem estados energéticos e estruturas similares, eles existem em solução e, portanto, a probabilidade de acoplamento de um ligante a uma proteína deve levar em conta o número de sítios livres que essa proteína possui. Assim, considerando que esses isômeros possuem níveis similares de energia, as constantes de equilíbrio estatísticas podem ser determinadas a partir das constantes intrínsecas da seguinte forma (Antonini e Brunori, 1971):

$$K_{stat,j}' = \frac{\binom{n}{j}}{\binom{n}{j-1}} K_j' = \frac{n-j+1}{j} K_j'$$
(15)

Essa é a primeira constante a ser obtida a partir de um ajuste por mínimos quadrados dos resultados experimentais. No apêndice B é apresentada uma discussão mais detalhada acerca da natureza dessa equação.

4. DESENVOLVIMENTO DO MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

As Eqs. 9 a 12 mostram que as concentrações das espécies proteicas em solução dependem dos valores de $\Delta G'_{J}$ e $\Delta G'_{D,I}$, os quais são dependentes da força iônica e do pH. Para condições de força iônica muito baixa, ln (γ_{\pm}) tende a zero e a proteína pode se adaptar a mudanças no pH modificando os estados energéticos aparentes das diferentes espécies presentes em solução. Essa propriedade poderia modular o fenômeno cooperativo por meio de ação de massas apenas. Entretanto, mudanças na concentração de prótons podem também modificar o estado de protonação dessas espécies. Isso, por sua vez, pode resultar na formação de tautômeros, como as formas estruturais *T* (tensa) e *R* (relaxada) observadas para Hb humana com graus de interação proteína-proteína, proteína-ligante e proteína-solvente que diferem das primeiras espécies consideradas pelas equações de equilíbrio e pelos fatores estatísticos para cada estado de saturação.

A captação ou liberação de prótons ou outro efetor qualquer por uma proteína em diferentes valores de pH pode ser especificada conforme mostrado na Fig. 1 A . Cada sub-tipo de fenômeno modifica os estados energéticos das espécies protéicas, interferindo em seus níveis energéticos aparentes de maneira distinta para cada espécie (Fig. 1 B). A dissociação e a oxigenação das espécies dissociadas (não mostradas), envolvem conceitos similares. Os estados energéticos dessas espécies dependem do seu estado de protonação em um dado pH, o que, por sua vez, depende dos fenômenos F_0 , F_c , F_d e F_{cd} . Nesse caso, uma mudança no pH pode modificar as relações energéticas de maneira distinta dependendo da intensidade de cada um desses fenômenos, tornando possível no estado de equilíbrio o aparecimento de espécies em solução em estados de protonação não observados em outras condições de pH.

A consequência fundamental é uma adaptação desse sistema por meio de uma modulação das relações energéticas entre as espécies dissociadas, do grau de saturação e da formação de tautômeros. O aparecimento de um novo grupo de espécies devido apenas ao fenômeno F_0 não afeta o acoplamento ou a dissociação destas, mas modifica a dependência energética entre esses tautômeros frente a mudanças no pH, Fig. 1 B (parte r = 0 para 2).



FIGURA 1. (A) Modos de protonação/desprotonação de uma proteína com base na relação entre prótons e acoplamento do ligante ou dissociação da proteína. F_0 - não relacionado ao acoplamento do ligante ou ao processo de dissociação; F_c - relacionado apenas ao acoplamento do ligante, mas sem que o mesmo ocorra; F_d - relacionado apenas à dissociação, mas sem que a mesma ocorra; F_{cd} - relacionado simultaneamente ao acoplamento do ligante e ao processo de dissociação, mas sem que ambos os processos ocorram; F_{Cd} - causado pelo acoplamento do ligante e relacionado à dissociação, mas sem que a última ocorra; F_{cD} - causado pela dissociação e relacionado ao acoplamento do ligante, mas sem que o último ocorra; F_c - causado pelo acoplamento do ligante; F_{CD} - causado pelo acoplamento do ligante e pelo processo de dis



FIGURA 1(B) Diagrama de energia livre de Gibbs do acoplamento proteína-ligante e formação de tautômeros em dois valores de pH (x e y). a_x , a_y , b_x e b_y correspondem às energias livres do acoplamento do ligante em pH x e y para espécies com l = j-l ligantes acoplados, que corresponde ao $\Delta G'_j$ para esses valores de pH. c_x e c_y são as energias livres de protonação, resultados da reação $P_l^{Z_l^{r-1}} \leftarrow \frac{r-1}{r-1}K_l \rightarrow P_l^{Z_l^r} + \frac{r}{r-1}\mathcal{D}H^+$, onde r indica o estado de protonação das espécies com l ligantes acoplados. Nesse diagrama, os prótons liberados devido aos fenômenos F_0 ou F_d não alteram os valores de $\Delta G'_j$ para cada tautômero. O processo de dissociação pode ser representado por meio de considerações análogas. Tautômeros com afinidades distintas pelo ligante, tais como as formas $T \, e R$, ocorrem apenas quando o fenômeno F_c toma parte (parte r = 3 na Fig. 1 B). Nesse caso, a formação dessas novas espécies pode incluir também o fenômeno F_0 devido a uma possível presença de resíduos mais suscetíveis a protonação ou desprotonação nesse novo valor de pH.

O efeito clássico de prótons em Hbs, efeito Bohr, observado por meio da mudança na afinidade de uma proteína pelo ligante quando variações na concentração prótons livres em solução ocorre, estaria associado, segundo a presente proposta, aos fenômenos F_C , F_{Cd} e F_{CD} e poderia ser modificado por F_c , F_{cd} e F_{cD} , mas não seria afetado por F_0 , F_d e F_D . Em um estudo preliminar do modelo Stc para Hbs, considerou-se que, para uma dada mudança no pH (de *x* para *y* na Fig. 1 B), a proteína poderia se adaptar ao novo pH sem uma formação significativa de tautômeros (parte r = 3) para qualquer estado de oxigenação. Considerando o caso particular no qual o número de prótons envolvidos durante o acoplamento (prótons de Bohr) e dissociação é aproximadamente constante para a faixa de pH analisada, i.e., negligenciando-se os fenômenos F_c , F_d e F_{cd} , o número de prótons envolvidos no processo de acoplamento do ligante e dissociação pode ser obtido a partir da forma derivada das Eqs.11 e 12, respectivamente. Para o processo de oxigenação, esse procedimento conduz às seguintes equações (Wyman, 1964):

$$v_{j} = \frac{\Delta G'_{j,pH_{y}} - \Delta G'_{j,pH_{x}}}{2,303 RT (pH_{x} - pH_{y})}$$
(16)

onde $\Delta G_{j,pH_x}^{'}$ e $\Delta G_{j,pH_y}^{'}$ são os parâmetros $\Delta G_j^{'}$ a pH x e y, respectivamente.

Uma equação análoga pode ser obtida para a dissociação usando-se os valores aparentes de energia livre de Gibbs para esse processo. A partir da Eq. 16, conclui-se que a inclinação da

curva de ΔG_j versus pH é proporcional ao número de prótons envolvidos em cada reação. A Fig. 2 A mostra esse tipo de resultado para a oxigenação da Hb humana com base em dados experimentais da literatura obtidos por Imai e Yonetani (1975), e a Fig. 4 B (inclusão) mostra tais resultados para o processo de dissociação tetrâmero-dímero (Chu et al., 1984). Pequenas flutuações podem produzir grandes desvios no número de prótons estimado em cada etapa se o mesmo é calculado com base em dois pontos consecutivos, conforme obtido previamente (Imai and Yonetani, 1975; Chu et al., 1984). Dessa forma, considerando os valores experimentais para ΔG_I a pH 7,2 e pH 7,4 (Fig. 2 A), um desvio de 5% nos valores experimentais para ΔG_I em pH 7,4 gera um erro de cerca de 3700% no número estimado de prótons envolvidos nessa etapa. Conclui-se dessa observação que o número de prótons que tomam parte nestes processos apresenta uma grande dependência da precisão do método usado para obtenção dessas energias.

Isso ocorre mesmo considerando que flutuações de cerca de 40% nas respectivas constantes de equilíbrio obtidas por ajuste dos dados experimentais por mínimos quadrados são necessárias para produzir um desvio de 7% nos valores absolutos de $\Delta G'_j$ (Weber, 1992, p. 107). Desde que os dados na Fig. 2 A incluem flutuações esperadas para medidas experimentais, a natureza desses dados sugere um comportamento linear para uma considerável faixa analisada de pH, com um número constante de prótons proporcional à inclinação das linhas obtidas por meio de um ajuste linear das energias obtidas para cada etapa de reação. Os resultados mostrados nessa figura foram obtidos com base no esquema



FIGURA 2. (A) Efeito de pH na energia livre de Gibbs para cada etapa de acoplamento de oxigênio à Hb humana. Os dados originais (Tabela 1, Imai and Yonetani, 1975) foram obtidos espectrofotometricamente, e com auxílio de um sensor de oxigênio, e foram ajustados por meio de regressão linear para o cálculo de v_j e ΔG_j utilizando a Eq. 11. (**Inclusão**) Representação esquemática das relações de equilíbrio consideradas pelo modelo Stc para a ligação da Hb humana com o ligante, e para o processo de dissociação da mesma. Para a Hb da serpente, foram consideradas as mesmas reações, porém com participação de ATP no processo de associação, mostrado na Eq. 24.

clássico de Adair, Antonini e Brunori (1971), assumindo-se um grupo de cinco espécies protéicas em equilíbrio, P_{l (l=0 a 4)}. Esses resultados também indicam que as propriedades médias padrão desse grupo de espécies proteicas em solução permanecem constantes nessa faixa de pH para cada estado de saturação pelo ligante. Isso sugere uma alta estabilidade das estruturas hipoteticamente consideradas em detrimento da formação de outras espécies, e reforça a hipótese adotada de estados de protonação distintos e constantes para cada grau de saturação dessa proteína durante o exercício normal de suas funções. Conforme será visto, essa consideração aplicada ao modelo Stc fornece resultados em concordância com os dados experimentais mesmo para uma ampla faixa de pH. Argumentos similares podem ser considerados para o processo de dissociação para diferentes faixas de pH (Fig. 4 B, inclusão) usando-se uma expressão análoga à Eq. 16. O modelo Stc também pode contemplar um sistema no qual v_i varia com o pH introduzindo-se um novo grupo de espécies em equilíbrio (parte r = 3 na Fig. 1 B), mas tal procedimento não é necessário para Hbs na faixa de pH analisada. Essa introdução pode ser feita de maneira similar àquela usada para o modelo de dois estados, mas com a condição inicial de que tais transições entre essas espécies tautoméricas e seus processos de acoplamento e dissociação podem envolver os fenômenos descritos na Fig. 1 B e as possíveis mudanças estruturais e de afinidade resultantes desses fenômenos.

5. APLICAÇÃO DO MODELO ESTEQUIOMÉTRICO A DADOS DA LITERATURA

O primeiro passo na aplicação deste modelo para proteínas em geral consiste em obter um número de dados experimentais suficiente para permitir um ajuste das equações teóricas em diferentes condições de pH, força iônica, concentrações de proteína ou efetor para o processo em

questão. No caso da Hb humana, as relações de equilíbrio consideradas foram aquelas obtidas por um esquema Adair de reações incluídas do processo de dissociação, oxigenação do dímero e participação de prótons (Fig. 2 A inclusão). Dessa forma, considera-se aqui a presença de oito espécies em equilíbrio (cinco como tetrâmero $P_{l(l=0 a 4)}$ e três como dímero $D_{l(l=0 a 2)}$), de tal forma que as constantes aparentes de equilíbrio obtidas por Imai e Yonetani (1975) para a oxigenação do tetrâmero (Fig. 2 A), e aquela obtidas por Chu et al. (1984) para a dissociação da espécie desoxigenada (Fig. 4 B, inclusão), foram diretamente correlacionadas com o lado esquerdo das Eqs. 13 e 14 para cada condição de pH a uma temperatura de 293 K. A energia livre de Gibbs para a oxigenação das espécies diméricas foi considerada constante e igual a -8,4 kcal/mol, Chu et al. (1984), para os dois passos de acoplamento em toda a faixa de pH analisada. Inicialmente, o modelo foi ajustado a partir dos resultados fornecidos por Imai e Yonetani entre pH 6,5 e 8,0 e, em seguida, para uma faixa mais larga de pH (pH 6,5 a 8,8). Dessa forma, com base no ajuste mostrado na Fig. 2 A para a primeira faixa de pH e se considerando as Eqs. 11 e 12, pode-se estimar os valores de v_i , resultando $v_1 = +0,46$, $v_2 = +0,657$, $v_3 = +0,956$ e $v_4 = 0,084$. A partir de um procedimento análogo e baseado na aproximação mostrada na Fig. 4 B (inclusão), obtém-se $v_{D,0} = 1$. Os respectivos valores intrínsecos obtidos para ΔG_j e $\Delta G_{D,0}$ foram $\Delta G_l = -1,394$ kcal/mol, ΔG_2 = +0,199 kcal/mol, ΔG_3 = +2,777 kcal/mol, ΔG_4 = -8,230 kcal/mol e $\Delta G_{D,0}$ = +24,430 kcal/mol. Esses valores são pH-independentes pois correspondem às energias padrões de reação, visto estarmos desprezando hipoteticamente a contribuição iônica na Eq. 5, dessa forma, estes valores foram obtidos extrapolando-se a atividade dos prótons para 1 na Eq. 11. Os valores intrínsecos para $\Delta G_{D,l}$ em outros níveis de saturação foram obtidos usando-se uma combinação linear das respectivas reações independentes de equilíbrio que descrevem o processo de dissociação de P_l , assim $\Delta G_{D,2}$ pode ser calculado como $\Delta G_{D,2} = \Delta G_{D,0}$ (correspondente à energia

de dissociação de P_0) - 2 x 8,4 (referente a duas oxigenações do dímero (kcal/mol)) - ΔG_1 (energia de oxigenação de $P_0 \rightarrow P_1$)- ΔG_2 (energia de oxigenação de $P_1 \rightarrow P_2$). Como resultado dessas combinações lineares obtém-se a variação energética referente ao processo em questão, $P_2 \rightarrow D_0 + D_2$ (2D₁), o que fornece $\Delta G_{D,2} = +8,825$ kcal/mol. De maneira similar obtém-se que $\Delta G_{D,1}$ = +17,424 kcal/mol, $\Delta G_{D,3}$ = -2,352 kcal/mol e $\Delta G_{D,4}$ = -2,522 kcal/mol. Com base nas Eqs. 11 e 12 os valores aparentes desses parâmetros previstos pelo modelo podem ser obtidos para cada pH. O número de prótons envolvidos nos outros passos de dissociação pode ser obtido por meio de combinações lineares das equações independentes de equilíbrio que geram a dissociação da espécie analisada, usando um procedimento análogo ao discutido anteriormente, porém, levando em consideração o número de prótons envolvidos em cada etapa e não os valores de energia livre das mesmas. Tal procedimento fornece para esse primeiro ajuste $v_{D,1}$ = +0,540, $v_{D,2}$ = -0,117, $v_{D,3}$ = -1,074 e $v_{D,4}$ = -1,158. Para a larga faixa de pH (pH 6,5 a 8,8), usando o modelo Stc (Fig 2 A), é obtida a seguinte estequiometria para tais processos: $v_1 = +0,394$, $v_2 = +0,637$, v_3 = +0,795 e v_4 = 0,081; e valores de ΔG_j correspondentes a ΔG_1 =-2,012 kcal/mol, ΔG_2 =-0,0037 kcal/mol, ΔG_3 =+1,26 kcal/mol e ΔG_4 =-8,265 kcal/mol. Substituindo esses resultados na Eq. 11 e tomando os valores para $v_{D,0}$ e $\Delta G_{D,0}$ obtidos anteriormente, conduziu-se esse segundo teste usando a mesma metodologia com o objetivo de avaliar a estabilidade dos parâmetros de análise que serão descritos aqui e de obter avanços acerca do mecanismo de formação de tautômeros.

Embora as constantes aparentes de Adair para o equilíbrio tenham sido tomadas diretamente de resultados obtidos por outros autores, esses valores poderiam ser obtidos usandose um ajuste por mínimos quadrados idêntico ao desenvolvido para o esquema de Adair, mas agora considerando-se o caráter aparente dessas constantes. Os valores estatísticos para essas mudanças energéticas podem ser obtidos considerando-se a Eq. 15 para o acoplamento do ligante ao tetrâmero (n=4) e ao dímero (n=2) com base em considerações similares, Apêndice B.

A aplicação das Eqs. 11 a 15 a uma série de reações independentes em condições de força iônica muito baixas pode descrever o comportamento de todas as espécies de Hbs consideradas e, ao mesmo tempo, dá condições para se checar os dados experimentais. Conforme mostrado na Fig. 2 B, a curva de afinidade pelo oxigênio superpõe os resultados experimentais, mostrando ser razoável considerar constante o número de prótons de cada etapa. Aqui, o efeito Bohr alcalino pode ser explicado por ação de massas para uma faixa de pH considerável. Os resultados baseados no segundo ajuste para uma larga faixa de pH mostram desvios para alguns valores de pH mas fornecem uma melhor expressão do comportamento médio esperado para os valores *log* $(pO_2)_{50}$ sobre uma faixa de pH mais ampla.

Outras informações podem ser obtidas com base no coeficiente de Hill, H_c , Antonini e Brunori (1971), definido como

$$H_{c} = \frac{\partial \log\left(\frac{Y}{1-Y}\right)}{\partial \log(pO_{2})}$$
(17)



FIGURA 2. (**B**) Efeito de pH na afinidade da Hb pelo oxigênio (*log* P_{50}). Os dados experimentais para a Hb humana (140µM de heme) foram extraídos da Tabela 1 em Imai and Yonetani (1975). O comportamento teórico previsto pelo modelo Stc para Hbs humana e de serpente foi obtido com de um programa escrito em C⁺⁺ e compilado pelo *GNU octave*, que é baseado na sub-rotina híbrida *Minpack* para resolução de equações não lineares. Os valores de V_j para Hb humana citados no texto foram estimados, respectivamente, por meio da Fig. 2 A. Todas as curvas teóricas foram baseadas na Eq. 9. Nesse caso, os valores de P_{50} foram obtidos para valores de Y=0.5, resolvidos com um erro menor que 10⁻⁵. As curvas teóricas correspondentes aos modelos de dois e três estados foram baseadas na participação de prótons Bohr V_B na transição T - R, ou $V_{B/2}$ na transição T - H e H - R, e os resultados foram obtidos com ajuda de planilhas de cálculos desenvolvidas para tal processo (veja texto e as Eqs. 29 a 31).

onde Y é o grau de saturação da Hb definido como a razão entre os sítios ocupados por ligantes e

o número total de sítios, e pO_2 é a pressão parcial de oxigênio (considerada neste trabalho em
unidades de mmHg). $H_c = 1$ implica um acoplamento simples, enquanto $H_c > 1$ indica cooperatividade e $H_c < 1$ indica um processo antagônico.

Os valores de H_c para 50% de saturação da Hb humana variaram de 2,85 para 2,7 na faixa de pH de 6,5 a 9,0, indicando uma redução no caráter cooperativo dessa Hb (Imai and Yonetani, 1975). O modelo Stc prevê tal comportamento com considerável precisão, sugerindo uma grande concordância com os dados experimentais obtidos para esse parâmetro em relação a ambos os ajustes (Fig. 3 A). Conclusões mais profundas podem ser obtidas por meio da análise do comportamento do H_c no decorrer de todo o processo de saturação, conforme mostrado na Fig. 3 B. Note que em pH básico o efeito de cooperatividade predito desloca-se dos últimos passos de acoplamento, se comparado a valores ácidos de pH, nos quais o efeito cooperativo é mais pronunciado nos últimos passos. Esta natureza assimétrica pode ser caracterizada utilizando-se o parâmetro de assimetria, Λ_{ap} (Weber, 1982), o qual informa como o efeito cooperativo está distribuído durante o processo de acoplamento, e é definido em relação às constantes aparentes de equilíbrio para o acoplamento como

$$\Lambda_{ap} = \ln \left(\frac{K_1^{'} K_4^{'}}{K_2^{'} K_3^{'}} \right)$$
(18)

Aqui, $\Lambda_{ap} < 0$ corresponde a um maior efeito cooperativo nos primeiros passos e $\Lambda_{ap} > 0$ representa um efeito cooperativo mais pronunciado nos últimos passos do acoplamento



FIGURA 3. (A) Efeito do pH no coeficiente de Hill. Os dados experimentais para Hb humana (140 μ M como heme) foram baseados na Tabela 1, em Imai and Yonetani (1975). O comportamento teórico previsto pelos modelos Stc, de dois estados e de três estados para Hb humana foi baseado nas Eqs. 11 e 17. A curva log(Y/(1-Y)) versus $log(pO_2)$ foi obtida através dos cálculos das constantes de equilíbrio (Eq. 9) e com ajustes iniciais feitos para cada modelo. Os valores de *Hc* a 50% de saturação foram calculados utilizando-se a Eq. 17. Os valores experimentais foram calculados por meio de um procedimento similar.



FIGURA 3. (**B**) Efeito do número médio de ligantes acoplados por mol de Hb humana ($\langle n \rangle$) no coeficiente de Hill, previsto pelos modelos de dois estados e de três estados, com base na Tabela 1 de Imai and Yonetani (1975), e nas Eqs. 9 e 17. Os dados foram obtidos através de procedimento descrito na Fig. 3 A, neste caso para o intervalo completo de saturação.



FIGURA 3. (**B**) Efeito do número médio de ligantes acoplados por mol de Hb humana ($\langle n \rangle$) no coeficiente de Hill, previsto pelos modelos Stc com base na Tabela 1 de Imai and Yonetani (1975), e nas Eqs. 9 e 17. Os dados foram obtidos através de procedimento descrito na Fig. 3 A, neste caso para o intervalo completo de saturação.

do oxigênio (correspondendo ao comportamento em pH fisiológico para a Hb humana) (Fig. 4 A). Um valor de $\Lambda_{ap} = 0$ indica comportamento simétrico, com maior cooperatividade a 50% de saturação de Hb. O subscrito *ap* indica o caráter *aparente* deste parâmetro, desde que ele é baseado nos valores de K'_{ij} , os quais são pH dependente.

Neste trabalho é proposta uma definição mais completa para Λ_{ap} , com base nas suas respectivas constantes K_i de equilíbrio, i.e., a 'assimetria real', Λ_{real} , onde

$$\Lambda_{real} = ln \left(\frac{K_1 K_4}{K_2 K_3} \right) \implies \Lambda_{ap} = \Lambda_{real} - 2,303 \upsilon_{\Lambda} pH$$
(19)

Onde a constante de assimetria de prótons, v_A , é definida como

$$\boldsymbol{v}_{\Lambda} = \boldsymbol{v}_2 + \boldsymbol{v}_3 - \boldsymbol{v}_1 - \boldsymbol{v}_4 \tag{20}$$

Essa constante pode modular o comportamento das proteínas quando sujeitas a mudanças no pH, e reflete a estequiometria relativa de prótons entre cada estágio do acoplamento. Assim, para valores positivos de v_A , um aumento no pH gera uma redução na assimetria aparente, enquanto que para valores negativos o efeito é oposto. Essa propriedade é exclusiva do modelo Stc, uma vez que é esperado que os modelos clássicos apenas contemplem uma mudança na assimetria com o pH por meio de modificações das energias livres de Gibbs entre as espécies tautoméricas presentes no sistema. A Fig. 4 A mostra o comportamento predito pelo modelo Stc. A Λ_{ap} , obtida a partir das Eq. 18 a 20, está de acordo com os resultados experimentais (Imai e Yonetani, 1975) e mostra um aumento na assimetria para essa Hb conforme o pH é reduzido. Essa mudança se deve à ação de massas de prótons que



FIGURA 4. (A) Efeito de pH na simetria aparente. Dados experimentais baseados na Tabela 1 de Imai e Yonetani (1975), e em Bonafe et al. (1999). O comportamento teórico previsto pelos modelos Stc, dois estados e três estados para Hb humana, e pelo modelo Stc para Hb de serpente foi obtido com base nas Eqs. 9, 11, 13 e 18 para cada condição. No caso dos modelos de dois e três estados foi utilizado o procedimento global para obtenção das constantes de equilíbrio.

modifica as relações entre as constantes de equilíbrio aparentes para o acoplamento K'_{j} , favorecendo um estado de equilíbrio com tendência a formar espécies protéicas com graus distintos de afinidade pelo ligante e promovendo, dessa forma, uma redistribuição do caráter

cooperativo para cada condição de pH no meio. Os valores calculados para Λ_{real} e υ_{Λ} foram, respectivamente, +21,64 e +1,07, enquanto para a maior faixa de pH ajustada, Λ_{real} foi +19,81 e v_{Λ} foi +0,956. Desde de que a assimetria baseada em valores intrínsecos das constantes de equilíbrio é idêntica à obtida a partir das constantes estatísticas (observe as Eqs. 15 e 18), esse aspecto não é especificado. O significado fisiológico para os valores obtidos para esse parâmetro foi proposto por Weber (1982), que observou que os valores positivos alcançados pela Hb humana indicavam maior cooperatividade nos últimos passos do acoplamento. Esse fenômeno permite uma otimização da função protéica, uma vez que essas Hbs atuam em uma faixa de saturação de 65% a ~100%. Esses resultados foram no entanto obtidos para um dado valor de pH, embora esse fenômeno seja muito mais dinâmico. O aumento na assimetria para valores reduzidos de pH (Fig. 4 A) pode conduzir a uma maior eficiência no transporte de oxigênio por meio de uma redução adicional na afinidade aparente das espécies em solução e um consequente deslocamento do efeito cooperativo para os últimos passos. Uma alta concentração de prótons induz a dissociação do oxigênio preferencialmente a partir das espécies que realizam esse processo retirando o maior número de prótons do meio, promovendo dessa forma uma grande liberação de oxigênio nos tecidos, uma vez que tais espécies correspondem àquelas com menor grau de saturação. Esse efeito é mais pronunciado em presença de fosfatos orgânicos, os quais aumentam a assimetria estabilizando preferencialmente as espécies menos saturadas (Weber, 1982).

As mudanças na afinidade entre as subunidades no decorrer do acoplamento do ligante podem ser acompanhadas com base no índice de efeito I_{ap} (Weber, 1984). Aqui, novamente, usase o subscrito *ap* para expressar a sua natureza aparente. Esse parâmetro indica a tendência à dissociação durante um acoplamento cooperativo ou antagônico, e é definido para Hbs como

$$I_{ap} = \frac{\left| \Delta G_{D,4}^{'} - \Delta G_{D,2}^{'} \right|}{\left| \Delta G_{D,2}^{'} - \Delta G_{D,0}^{'} \right|}$$
(21)

Para valores de $I_{ap} < 1$, o acoplamento é dito de primeira ordem. Nesse caso, o acoplamento do oxigênio aumenta a tendência da proteína a se dissociar durante um processo cooperativo, principalmente nos primeiros passos do acoplamento, enquanto em um processo antagônico a tendência é no sentido da associação. Para $I_{ap} > 1$ o acoplamento é de segunda ordem envolvendo um processo cooperativo ou antagônico com a mesma tendência observada para acoplamentos de primeira ordem, porém ocorrendo principalmente nas últimas etapas do acoplamento. Para estender o conceito de índice de efeito, propõe-se aqui o 'índice de efeito real', I_{real} , com base nos valores de $\Delta G_{D,l}$, onde

$$I_{real} = \frac{\Delta G_{D,4} - \Delta G_{D,2}}{\Delta G_{D,2} - \Delta G_{D,0}}$$

A relação entre os parâmetros reais e aparentes é dada por

$$I_{ap} = \frac{I_{real} \left(\Delta G_{D,2} - \Delta G_{D,0}\right) + 2.303 \left(\upsilon_{D,2} - \upsilon_{D,4}\right) RTpH}{\Delta G_{D,2} - \Delta G_{D,0} + 2.303 \left(\upsilon_{D,0} - \upsilon_{D,2}\right) RTpH}$$
(22)

Um outro parâmetro muito útil para a predição do comportamento expresso pelo I_{ap} em relação ao pH, a constante de índice de efeito de prótons, v_I , é proposto aqui e corresponde a

$$v_I = \frac{v_{D,2} - v_{D,4}}{v_{D,0} - v_{D,2}} \tag{23}$$

Esse parâmetro têm a mesma natureza do parâmetro de assimetria, porém ele atua de uma maneira um pouco mais complexa que será discutida numa outra oportunidade. Em linhas gerais essa constante carrega implicitamente informações acerca de mudanças no índice de efeito geradas por variações no pH, assim, pode-se concluir a partir desse parâmetro se tais mudanças vão alterar a ordem do acoplamento e de que forma. Os valores intrínsecos de I_{real} e v_l para a Hb humana foram +0,727 e +0,932, respectivamente, enquanto os valores estatísticos para I_{ap} foram obtidos usando-se a Eq. 15 (n = 4) para o tetrâmero e (n = 2) para o dímero nas Eqs. 21 e 22, as quais forneceram valores de $I_{real}(estat)$ = +0,717 tal que $\Delta G_{D,0}(estat)$ = +24,43 kcal/mol, $\Delta G_{D,1}(estat)$ = +17,827 kcal/mol, ^a $\Delta G_{D,2}(estat)$ = +9,223 kcal/mol, $\Delta G_{D,3}(estat)$ = -1,948 kcal/mol e $\Delta G_{D,4}(estat)$ = -2,522 kcal/mol. Os valores para I_{ap} obtidos pelo modelo estequiométrico para Hb humana correspondentes ao ajuste para uma ampla faixa de pH, foram calculados por meio de um procedimento análogo ao do primeiro ajuste e é também mostrado na Fig. 4 B.



FIGURA 4. (**B**) Influência do pH no índice de efeito da Hb humana (140µM como heme). O comportamento teórico previsto pelo modelo Stc foi baseado nos dados experimentais da Tabela 1, em Imai e Yonetani (1975), Chu et al. (1984) e nas Eqs. 9-12 e 21-23. Aqui, os valores intrínsecos para a energia livre de Gibbs média de dissociação para espécies biligadas foram considerados como $RT\ln([D_1]^2/[P_2]) = RT\ln(([D_0] [D_2])/[P_2])$ para cada condição de pH. (**Inclusão**) Efeito de pH na energia livre de Gibbs de dissociação de Hb humana com *l* ligantes acoplados. Os resultados foram obtidos para a forma deoxi diretamente pelo de ajuste de curva dos dados experimentais (Chu et al., 1984). Os cálculos da energia livre de dissociação foram baseados nos resultados obtidos na Fig. 2 A e B, considerando ΔG de oxigenação de 8,4 kcal/mol para Hb humana. Para outros graus de saturação com o ligante, os valores de energia livre foram obtidos por combinação linear.

Estas curvas refletem a dependência em relação ao pH dos valores de $\Delta G'_{D,l}$ (Fig. 4 B, inclusão) dado pelas Eqs. 22 e 23. Em concordância com os resultados obtidos por Chu et al. (1984), as variações energéticas intrínsecas mostraram um aumento em $\Delta G'_{D,l}$ para baixos valores de pH para a Hb deoxi e para as espécies com um ligante acoplado, enquanto o oposto foi observado para as outras espécies (Fig. 4 B, inclusão). Um outro ponto a ser notado nesta figura, que também está de acordo com os dados fornecidos por Chu et al. (1984), é que $\Delta G'_{D,3} < \Delta G'_{D,4}$. Esses resultados teóricos confirmam a aplicabilidade do procedimento utilizado aqui, já que foram obtidos com base unicamente nos dados fornecidos por esses autores para a dissociação da espécie deoxi e naqueles obtidos por Imai e Yonetani (1975) para a oxigenação do tetrâmero. O caráter cooperativo dessa Hb na faixa de pH 6,0 – 9,0, com um H_c ao redor de 2,8 (Fig. 3 A), conduz a um processo cooperativo com tendência a dissociação mais acentuada nos primeiros passos do acoplamento ($I_{ap} < 1$) para os casos estatístico e intrínseco em valores de pH abaixo de 9,5 (Fig. 4 B). A manutenção desta natureza cooperativa para valores de pH > 9,5 sugere que há uma mudança para um acoplamento de segunda ordem com uma posterior intersecção dos valores de $\Delta G'_{D,0}$ e $\Delta G'_{D,2}$ nas vizinhanças de valores de pH =10,5, assim I_{ap} torna-se > 1. Este resultado reflete a intersecção ou mudança nas relações entre os valores de $\Delta G'_{D,l}$ para os primeiros e últimos estados de saturação protéica (Fig. 4 B, inclusão).

O efeito do pH no estado de agregação da Hb a 50% de saturação predito pelo modelo Stc pode ser observado na Fig. 5 A e B. Em uma faixa tão ampla de pH, poder-se-ia esperar que outros fatores afetassem o processo, tais como efeito Bohr ácido, formação de tautômeros ou mesmo desnaturação, o que por sua vez ocasionaria o aparecimento de espécies em equilíbrio distintas das que foram consideradas inicialmente.



FIGURA 5. (A) Efeito de pH na dissociação de Hb a saturação de 50%. O comportamento teórico previsto pelo modelo Stc para Hb humana e de serpente foi baseado na Tabela 1, em Imai e Yonetani (1975), e na Tabela 3 e 4, em Chu et al. (1984), Bonafe et al (1999), e nas Eqs. 13 e 14. Tetrâmeros - símbolos abertos; dímeros - símbolos fechados. Esses resultados foram obtidos como descrito na Fig. 2 B, mas considerando o processo de dissociação e de oxigenação do dímero.



FIGURA 5. (**B**) Distribuição das formas em Hb humana e de Hb humana e de serpente a 50% de saturação de acordo com o modelo Stc, com base nos dados experimentais de Imai and Yonetani (1975), Chu et al. (1984), Bonafe et al. (1999), e nas Eqs. 13 e 14. Os resultados foram baseados nas considerações feitas na Fig. 5 A. (**Inclusão**) Escala expandida da distribuição das formas de Hb.

Entretanto, essas figuras ilustram o comportamento hipotético do sistema na ausência de formação dessas novas espécies em equilíbrio. A Fig. 5 A mostra que uma redução no pH pode conduzir a um aumento na proporção com que tetrâmeros se dissociam em dímeros. Esse comportamento, observado a partir da Figs. 4 B (inclusão) e 5 B, ocorre predominantemente com as espécies com 3, 4, e em menor intensidade, para as espécies com 2 oxigênios acoplados, enquanto o oposto é observado para as espécies com 0 e 1 oxigênio acoplado.

A implicação fisiológica desse processo pode ser entendida se for considerado que um aumento na concentração relativa das espécies tetraméricas menos saturadas facilitará o desacoplamento do oxigênio dessas espécies, uma vez que esse processo envolve a captação de prótons, enquanto as formas tetraméricas completamente saturadas não sentem tanto essa modificação e estão mais sujeitas à dissociação. Esses resultados sugerem uma grande capacidade de adaptação dessas Hbs a cada condição de pH, tamponando o meio com a modulação de sua tendência a associar/dissociar e modificando a afinidade aparente dessas espécies pelo ligante.

A presença de íons como fosfatos orgânicos pode modificar as relações entre as curvas de $\Delta G'_{D,I}$ alterando os valores de I_{ap} já que esses íons afetam as interações entre as cadeias $\alpha_i\beta_j$, $\alpha_i\beta_i$ e $\beta\beta$ (Wyman, 1965; Perutz et al., 1968; Weber, 1972; Pettigrew et al., 1982; Weber, 1982, 1984). Consequentemente, a inversão observada na tendência da Hb humana a se dissociar a pH≈9 em presença de determinados íons fosfato (Weber, 1990), ainda sem explicação na literatura, pode ser entendida considerando que esses íons estabilizam preferencialmente as espécies menos saturadas, antecipando ou mesmo promovendo o comportamento predito pelo modelo Stc para valores de pH≈10,5 para o parâmetro I_{ap} , Fig. 4 B.

Especificando a extensão logarítmica da curva de diluição como a mudança na concentração inicial de proteína quando o grau de dissociação, $\underline{\alpha}$, definido na Fig. 6, varia de 0,1 a 0,9, expresso em unidades logarítmicas, Weber e Xu (1982) demonstraram que a redução observada nesse parâmetro durante a dissociação-associação da enolase e dansil conjugados dessa proteína poderia estar associada à formação de novas espécies provenientes de um processo de deriva conformacional das formas dissociadas. Isso, por sua vez, ocorreria como resultado de mudanças conformacionais tempo-dependentes destas espécies dissociadas em contato com as moléculas de solvente, de forma que a organização da água ao redor dessas formas dissociadas geraria simultaneamente um acréscimo nas suas energias livres de associação e perda na afinidade entre as subunidades como consequência desse processo de deriva conformacional. A descrição termodinâmica dessa dependência distinta da concentração no decorrer do processo de diluição foi proposta, em um primeiro momento, proposta assumindo-se uma perda contínua de energia livre de Gibbs de dissociação, mas tal modelo mostrou ter uma aplicabilidade limitada (Weber, 1986, 1987).

Uma representação mais adequada para tais processos foi obtida considerando-se um tratamento discreto das espécies envolvidas. Para isso, a participação das formas provenientes de deriva conformacional foi explicitamente considerada em equilíbrio com suas propriedades, sendo determinadas por um processo tempo-dependente governado por taxas de '*spoil*' e '*repair*' de suas estruturas em que a condição de equilíbrio seria obtida por meio de processos iterativos (Weber, 1986).



FIGURA 6. (A) Efeito da concentração de Hb humana no processo de dissociação em diferentes valores de pH (*Y*=0, 0,6 e 1), com base nos comportamentos teóricos previstos pelo modelo Stc, e nas Eqs. 10 e 12. *C* corresponde à concentração inicial de proteína $[P_0]_{init}$. Para graus de saturação intermediários, calculou-se a distribuição das espécies fixando-se o grau de saturação, a concentração de proteína e o pH, utilizando-se um programa similar ao descrito na Fig. 2 B. Nessa figura, o grau de dissociação foi obtido com base na extensão da reação para a dissociação de espécies deoxi, $X_{D,0}$, dada pela relação $\alpha = (\sum [D_i]) /(2x\sum [P_i] + \sum [D_i]) = X_{D,0} /C$, para qualquer grau de saturação da proteína.

Na presente descrição, não se pretende estender a aplicabilidade do modelo Stc para esse tipo de mecanismo, uma vez que isso pode ser feito utilizando-se um agregado protéico mais apropriado no qual esse fenômeno ocorra mais expressivamente. A Fig. 6 A, no entanto, mostra o comportamento previsto por este modelo para a Hb humana para alguns valores de pH em ausência de tal processo de deriva quando Y=0, 0,6 e 1. Conforme mostrado, para Y=0 a extensão logarítmica da curva de diluição permanece constante com o pH e com valor igual a 2,9 unidades, sendo que para um grau fixo de dissociação ocorre um deslocamento para baixas concentrações de proteína à medida em que o pH é reduzido. Esse valor de 2,9 unidades è próximo ao obtido por Xu e Weber (1982) de 2,86 unidades para enolase na ausência de deriva conformacional. Desvios desse comportamento são esperados quando espécies em deriva são formadas ou quando um novo grupo de espécies heterogêneas quanto à energia livre de dissociação é formado em quantidades significativas (Weber, 1986). Tal heterogeneidade física tem sido, até o momento, demonstrada apenas para processos de dissociação induzidos por pressão em grandes agregados protéicos (Paladine and Weber, 1981; Silva et al., 1989; Erijman and Weber, 1991; Bonafe et al., 1993; Ruan and Weber, 1993). Agora, pela primeira vez, pode-se observar esse complexo fenômeno por meio dos resultados fornecidos pelo modelo Stc para Hb humana em condições fisiológicas de 60% de saturação por oxigênio (Fig. 6 A). Esses resultados fornecem uma visualização direta deste fenômeno, muitas vezes extremamente 'abstrato', assim como avanços nas suas causas e nos mecanismos envolvidos em tais processos. Ao mesmo tempo, o modelo Stc fornece uma grande quantidade de informações úteis a respeito do comportamento desta Hb humana durante o exercício normal de suas funções.

A Fig. 6 A mostra que um aumento no grau de saturação das curvas de diluição (Y=0,6) causa um deslocamento em direção às formas mais saturadas, para valores de pH até 10,5,

quando comparada com a forma deoxi (*Y*=0), enquanto para valores mais altos de pH ocorre o oposto. Essa figura também fornece detalhes a respeito do número de estágios de dissociação visíveis para cada condição de pH. Dessa forma, a pH=6,5, a extensão logarítmica da curva de diluição aumentou para aproximadamente 6,5 unidades, decrescendo progressivamente até valores próximos a 2,9 a pH=8,8, em que os estágios distintos de dissociação tornaram-se imperceptíveis. Essas mudanças no pH não alteram de maneira significativa o grau de dissociação observado a uma concentração de proteína em torno de 10^{-8} M. Para maiores concentrações de proteína, um aumento no pH aumenta o grau de dissociação, enquanto o oposto é observado para menores concentrações. Para pH acima de 8,8, há um aumento progressivo nos valores da extensão logarítmica e um deslocamento em direção às formas associadas, conforme o pH ou o grau de saturação é aumentado.

As razões para tal comportamento podem ser entendidas se for considerado que cada espécie tetramérica possível (P_0 a P_4) se dissocia por meio de uma função não linear da concentração inicial de proteína (Eqs. 2 e 14); assim, cada uma dessas formas possui uma energia livre de Gibbs de dissociação distinta que poderá governar o caminho seguido durante a diluição de acordo com as espécies que prevalecem em solução, o número de efetores envolvidos na dissociação e o meio externo à proteína, gerando dessa forma os estágios distintos observados na curva de diluição. O efeito, observado por meio de mudanças no pH para concentrações iniciais de proteína maiores que 10^{-8} M, oposto àquele obtidos a concentrações menores, também pode ser explicado se considerarmos (com base nos resultados anteriores) que há liberação de prótons durante a dissociação das Hbs com zero e um ligante acoplado, enquanto para os outros estados de saturação (dois e principalmente três e quatro ligantes acoplados) ocorre uma captação. Dessa forma, um aumento no grau de dissociação para concentrações > 10^{-8} M conforme o pH é

reduzido (a partir de 8,8 sendo que o comportamento oposto observado para menores concentrações) sugere que as espécies preferenciais em dissociação para valores maiores que 10^{-8} M são as mais saturadas, pois estas captam prótons do meio externo durante esse processo, passando pelas espécies biligadas ou por uma distribuição equivalente menos sensível ao pH a 10^{-8} M, até dissociar as espécies restantes menos saturadas que liberam prótons, Fig. 6 B.

A observação de estágios distintos durante esse processo e a aparente ausência desse comportamento em pH=8,8 pode ser explicada considerando-se, por exemplo, a Fig. 2 A, a qual mostra que para altos valores de pH ocorre um aumento na afinidade pelo ligante e uma conseqüente redução no número de formas parcialmente oxigenadas, dada a maior espontaneidade dos passos intermediários, homogeneizando esse sistema em torno de uma espécie predominante sujeita à dissociação ou de um grupo de espécies com níveis similares de energia livre de dissociação (Fig. 4 B inclusão), causando assim a observada redução na extensão logarítmica da curva de diluição para 2,9 (Figs. 6 A e B). O aumento no grau de dissociação para altos níveis de saturação protéica e a subsequente inversão dessa tendência para valores de pH próximos a 10,5 podem ser analisados com a ajuda da Fig. 4 B (inclusão), que mostra que para valores de pH maiores que 10,5, a energia livre de Gibbs de dissociação para as espécies mais saturadas, que são as formas predominantes sujeitas a esse processo a Y=0,6, é maior do que aquelas observadas para a forma deoxi predominante a Y=0, gerando desta forma a inversão observada na Fig. 6 A.



FIGURA 6. (**B**) Curva de diluição para a Hb humana expressa em termos da distribuição relativa de tetrâmeros presentes em solução para cada concentração de proteína e de pH a 60% de saturação de Hb. Os resultados foram obtidos como descritos em (**A**), mas foram normalizados para expressar a fração relativa de tetrâmeros, independentemente do grau de dissociação.

A extensão logarítmica da curva de diluição a pH=11,8, o comportamento expresso a Y=1 e outros efeitos são, da mesma forma, um reflexo da interdependência entre essas energias livres

de Gibbs e das espécies protéicas presentes em solução para cada concentração inicial de proteína considerada.

A Fig. 6 B dá uma clara idéia dessas relações e fornece alguns avanços a respeito desse mecanismo e de sua modulação. Essa figura mostra a distribuição relativa de tetrâmeros como uma função da concentração inicial de proteína para determinados valores de pH, de tal forma que essas frações expressas para cada espécie foram normalizadas apenas em relação às formas tetraméricas presentes em solução a Y=0,6. Em outras palavras, a presença de dímeros não foi aqui considerada para facilitar a interpretação do mecanismo complexo de modulação envolvido e as espécies distintas responsáveis pela manifestação aparente do fenômeno de heterogeneidade quanto à energia livre de Gibbs. Uma análise conjunta dessa figura com aquelas obtidas anteriormente pelo modelo Stc fornece uma maneira de estender os conhecimentos acerca das propriedades da Hb humana, além de fornecer dados teóricos capazes de auxiliar o planejamento de novos experimentos. O fenômeno de heterogeneidade nas curvas de diluição é, dessa forma, uma manifestação das energias livres distintas de dissociação das espécies sujeitas a esse processo, e da proporção na qual elas ocorrem em solução. Esse fenômeno, por sua vez, pode ser modulado por efetores, acoplamento de ligantes, força iônica e temperatura (não discutida aqui), e pode ter tal modulação restringida de maneira distinta pelo efeito do íon comum e pela interdependência entre as diferentes formas agregadas, dada pelas relações acopladas de equilíbrio responsáveis por sua formação. Assim, se estas espécies não são interconvertíveis, esse fenômeno não ocorre, em contraste com o processo de dissociação por pressão no qual a heterogeneidade pode ser observada mesmo se as espécies em solução sujeitas à dissociação não forem interconvertíveis.

45

6. APLICAÇÃO DO MODELO ESTEQUIOMÉTRICO À Hb DE SERPENTE

Hemoglobinas de vertebrados ectotérmicos, devido a suas propriedades distintas representam uma excelente oportunidade para testar o modelo Stc (Brittain, 1988; Riggs, 1988; Weber and Jensen, 1988; Brittain, 1991). A acentuada dissociação da Hb de serpente em valores mais alcalinos de pH ou em ausência de fosfatos orgânicos foi demonstrada usando-se Hb da serpente *Helicops modestus* (Bonafe et al., 1999). Visando a uma compreensão mais profunda a respeito do papel do fosfato orgânico neste processo de associação-dissociação, utilizou-se uma análise multirreacional similar àquela usada para Hb humana, Fig. 2 A inclusão, mas que considera a participação do ATP durante o processo de dissociação, como segue:

$$Hb_{0}(ATP) \longleftrightarrow^{K_{D,0}} 2D_{0} + ATP + v_{D,0}H^{+}$$

$$\tag{24}$$

Embora seja necessária uma investigação mais completa desta Hb para se determinar suas constantes de equilíbrio, estes valores foram estimados com base na curva de *log* P_{50} versus pH. Assim, os parâmetros de equilíbrio foram obtidos por meio de uma aproximação da curva teórica e dos dados experimentais, de forma a conduzir ao ajuste mostrado na Fig. 2 B, considerando-se uma concentração inicial de Hb de 80 μ M como heme. A partir desse ajuste, a energia livre de Gibbs obtida foi de 8,1 kcal/mol para a oxigenação da forma dimérica, um resultado depois confirmado pelos valores experimentais e teóricos obtidos para a curva de *log* P_{50} da Hb na condição 'stripped' (isenta de ATP) e pelo grau de dissociação previsto e observado experimentalmente a pH 8,5 (Fig. 2 A em Bonafe et al., 1999). O número estimado de prótons liberados durante os *j* passos de oxigenação do tetrâmero foram $v_I = 0,55$, $v_2 = 0,65$, $v_3 = 0,75$, e $v_4 = 0,1$, enquanto os valores intrínsecos de ΔG para a oxigenação foram $\Delta G_1 = -1,2$ kcal/mol,

 $\Delta G_2 = +0,599$ kcal/mol, $\Delta G_3 = +2,530$ kcal/mol e $\Delta G_4 = -7,10$ kcal/mol, e os resultados obtidos para a dissociação foram $\Delta G_{D,0} = +38,37$ kcal/mol, $\Delta G_{D,1} = +31,47$ kcal/mol, $\Delta G_{D,2} = +22,77$ kcal/mol, $\Delta G_{D,3} = +12,14$ kcal/mol e $\Delta G_{D,4} = +11,5$ kcal/mol. Os valores obtidos para Λ_g , υ_Λ , υ_I e I_g foram, respectivamente, +19,64, +0,75, +0,71 e +0,72. A partir desses resultados, os respectivos parâmetros estatísticos podem ser obtidos conforme a metodologia utilizada para a Hb humana. O número total de prótons liberados estimado foi 2,6 para a dissociação da espécie tetramérica desoxigenada, ao passo que para a Hb humana esse número foi de 1,0 próton.

O alto número de prótons obtido para a Hb de serpente em presença de ATP sugere o importante papel desse efetor, assim como a forma como ele atua em ectotérmicos. As curvas para *log* P_{50} e H_c a 50% de saturação dessa Hb mostram uma clara dependência em relação à concentração de Hb e de ATP. A presença de apenas 0,01 mM de ATP foi suficiente para alterar de maneira marcante as propriedades dessa Hb quando comparada com a alta afinidade e acoplamento simples expressos pela forma 'stripped' (Figs. 2 B e 3 A).

A assimetria aparente desta Hb em diferentes valores de pH é altamente positiva, aumentando à medida em que o pH é reduzido (Fig. 4 A). Esse efeito na assimetria foi similar ao observado para a Hb humana e, da mesma forma, permite uma grande estabilização das formas tetraméricas menos saturadas, melhorando o suprimento de oxigênio. Essas observações sugerem que esse fenômeno tem um papel fisiológico e um mecanismo de atuação evolutivamente similar em ambas as Hbs. Os valores estatísticos para I_{ap} na região fisiológica de pH foram > 1 (Fig. 4 B), indicando um acoplamento de segunda ordem para essa Hb de ectotérmico. Com base no caráter cooperativo do H_c observado para esta faixa de pH (Figs. 3 A, 4 B, e 4 B inclusão), conclui-se que há um acoplamento cooperativo com tendência a dissociar, principalmente nos últimos passos, e um aumento na associação das formas diméricas à medida em que o pH é reduzido. Essa baixa afinidade do ATP pelas formas mais saturadas é também observada para a Hb humana e, mais uma vez, sugere a dependência evolutiva dos dois mecanismos distintos que governam a função dessa proteína. Assim, a redução no I_{ap} conforme o pH foi reduzido é uma consequência direta da mudança nas relações entre $|\Delta G'_{D,4} - \Delta G'_{D,2}| e |\Delta G'_{D,2} - \Delta G'_{D,0}|$ (Fig. 4 B, inclusão), onde $\Delta G'_{D,1} = -RT \ln(K'_{D,1})$ e $K'_{D,1} = K_{D,1} / (C_{H'}^{v_1} C_{ATP})$. Esse fenômeno aumenta a tendência à associação predominantemente pela formação de espécies menos saturadas. As Hbs humana e de serpente exibiram tendências opostas quanto à associação conforme o pH é reduzido, mas o papel fisiológico em relação ao pH dos valores intrínsecos de I_{ap} foram similares para ambas. Isso ocorre porque enquanto a Hb de serpente aumenta a a finidade entre as subunidades com maior tendência a associar as espécies mais saturadas conforme o pH é reduzido. Um transporte eficiente de oxigênio para condições diferentes é, dessa forma, alcançado por essas proteínas por meio de mecanismos distintos de associação/dissociação, promovendo maior liberação de oxigênio nos tecidos.

A distribuição de espécies prevista (Fig. 5 A) mostra a tendência da Hb de serpente a dissociar a 50% de saturação por oxigênio para uma larga faixa de pH. Embora esse fato tenha sido experimentalmente antecipado (Matsuura et al., 1987; Bonafe et al., 1999), a obtenção de uma estimativa quantitativa fornecida pelo modelo Stc (Fig. 5 B) conduz a novos avanços nesse mecanismo. Estes resultados mostram que mudanças na concentração de proteína e ATP modulam o caráter cooperativo desses sistemas e restringem as rotas seguidas durante a adaptação às mudanças no pH (Fig. 5 B). A dissociação da Hb de serpente pode ser explicada com base em substituições de resíduos de aminoácidos chaves presentes na interface $\alpha_1\beta_2$,

especificamente nas posições β 43 e β 101 (Matsuura et al., 1989), e sugere que outras substituições encontradas em vários outros grupos ectotérmicos (Watt et al., 1980; Aschauer, 1985; Abbasi et al., 1988; Rucknagel et al.,1988a, 1988b; Abbasi et al., 1991; Gorr, et al., 1991; Petruzzelli et al, 1996) expressam comportamento similar para os diversos níveis de saturação.

A curva de diluição obtida para esta Hb é mostrada na Fig. 6 C para uma faixa de pH de 7,0 a 8,0, e uma concentração de ATP de 1mM, em três diferentes graus de saturação por oxigênio (*Y*=0, 0,6 e 1). Essa figura confirma os dados experimentais e a importância do processo de associação obtido com auxílio do ATP, visto que essa proteína representa uma transição evolutiva dímero-tetrâmero (Bonafe et al., 1999), e não que ela existe predominantemente como tetrâmero em ausência de ATP conforme proposto na literatura. Dessa forma, em pH=7,0, pelo menos dois estágios distintos de dissociação são observados no decorrer da diluição para uma saturação *Y*=0,6 (Fig. 6 C). Isso, por sua vez, pode ser associado à presença de formas tetraméricas predominantes com distintos valores de $\Delta G'_{D_j}$, (Fig. 6 D e 4 B inclusão).



FIGURA 6. (C) Efeito da concentração de Hb de serpente a 1 mM de ATP no processo de dissociação, em diferentes valores de pH (Y=0, 0,6 e 1), com base nos comportamentos teóricos previstos pelo modelo Stc. Utilizou-se para a obtenção desses resultados um procedimento análogo ao descrito anteriormente para Hb humana, Figs. 2 A e 6 A, porém, considerando a presença de ATP no processo de dissociação, Eq. 24.



FIGURA 6. (**D**) Frações relativas de tetrâmeros obtidas pelo modelo Stc para várias concentrações de proteína em intervalo fisiológico de pH, Y=0,6. Esses resultados foram obtidos como previamente descrito na Fig. 6 **C** e expressam a distribuição relativa de espécies para as condições especificadas de pH e saturação.

O aumento no pH para esse grau de saturação gera um aumento na afinidade pelo ligante para todos os passos do acoplamento, tornando homogênea a composição de espécies em solução em torno de uma única espécie ou de um grupo com tendências semelhantes de dissociação. Conforme observado para a Hb humana, este processo irá reduzir o número de estágios nas curvas de diluição. Para os estados de saturação Y=0 e Y=1 esses distintos estágios não ocorrem, pois apenas um tipo de tetrâmero está virtualmente presente em solução. A extensão da curva de diluição manteve-se constante e igual a 2,9 unidades a Y=0 e Y=1 para a faixa de pH analisada, mas deslocou-se em direção a estados mais desagregados com o aumento do pH para ambos os casos. Essas tendências, contrastantes e opostas, observadas para as Hbs humana e de serpente, neste caso, ocorrem porque para qualquer grau de saturação protéica da Hb de serpente o processo de dissociação envolve a liberação de prótons (Fig. 4 B inclusão), sugerindo que o sítio de acoplamento do ATP pode envolver uma protonação adicional de alguns resíduos que interagem diretamente com a molécula de ATP durante o processo.

O aumento característico na extensão logarítmica para 5,6 unidades a Y=0,6 e pH=7,0 e a redução nesse valor para algo em torno de 4 unidades conforme o pH é aumentado para pH=8,0 reflete as restrições impostas pela presença de uma população heterogênea e a modulação deste fenômeno pelo pH. A Fig. 6 C mostra que uma mudança no grau de saturação em concentrações fisiológicas de proteína, ~3 mM a pH=7,2, aumenta o grau de dissociação de 0 para 30 e 50% a Y=0, 0, 6 e 1, respectivamente, reforçando dessa forma o papel importante deste mecanismo de transporte durante a evolução. A Fig. 6 D mostra que, embora mudanças no pH alterem o grau de dissociação para essa concentração de proteína (Figs. 6 C e 5), não há uma mudança significativa nas frações relativas de tetrâmeros nessas condições (Fig. 6 D). Assim, a 60% de saturação de Hb, a forma tetramérica predominante é aquela com um ligante acoplado, seguida pelas espécies com quatro, dois e zero ligantes, respectivamente. A Fig 6 B mostra que, no caso da Hb humana, as respectivas espécies predominantes são aquelas com quatro, seguidas pelas formas com zero, um, dois e três oxigênios acoplados.

A distribuição distinta fornecida por esses dois mecanismos tem uma função fisiológica e reflete a estabilidade reduzida das espécies mais saturadas desta Hb de serpente (Fig. 6 D). Dessa maneira, o transporte eficiente obtido por essas espécies ectotérmicas é alcançado por meio de uma distribuição seletiva das formas mais aptas a captar ou liberar prótons no decorrer do processo de oxigenação ou desoxigenação. Nesse caso, a presença de tetrâmeros predominantemente com um ligante acoplado a 60% de saturação de Hb aumenta significativamente o transporte de oxigênio, uma vez que tais tetrâmeros são as formas mais aptas a liberar esse ligante nessas condições, não apenas devido à sua baixa afinidade quando comparada com a de outros estados de saturação, mas também pelo caráter assimétrico e positivo do efeito cooperativo (a cooperatividade se desloca para os últimos estágios de acoplamento) e pelo aumento na formação deste tipo de tetrâmero conforme o pH é reduzido ($I_{ap} > 1$). Em contraste, a baixa estabilidade da forma tetramérica em estados mais saturados e sua modulação por mudanças no pH (Figs. 6 D, 5 e 4b inclusão) fornece mecanismos para uma captação eficiente de oxigênio por meio da formação de espécies dissociadas de alta afinidade e de mudanças na natureza do acoplamento cooperativo. A proporção relativa de espécies saturadas diminui conforme Y tende à unidade e quando o pH é aumentado (Λ_{ap} reduz e I_{ap} aumenta).

Para a Hb humana, o mecanismo envolvido é distinto e mais complexo, mas extremamente eficiente. Assim, o aumento no pH gera uma mudança mais significativa na população relativa de tetrâmeros de tal forma que a uma concentração de proteína de 3 mM, altos valores de pH geram uma redução nas formas P_0 , $P_1 e P_4$, enquanto as espécies $P_2 e P_3$ aumentam suas proporções (Fig. 6 B). Essas mudanças exercem um efeito aparente devido à maior associação das formas diméricas com zero e um ligante acoplado, gerando as formas $P_0 e P_1$, e devido ao aumento na afinidade das formas tetraméricas pelo ligante. Assim, para essa proteína, um aumento no pH gera um equilíbrio com um aumento no número de espécies mais saturadas P_4 e P_3 (Fig. 2 B) mas, ao mesmo tempo, uma diminuição na proporção relativa de P_4 em relação a P_3 como conseqüência de uma dissociação preferencial (Figs. 4b inclusão e 6 C). Uma redução no pH aumenta a dissociação, predominantemente por meio das espécies mais saturadas, contribuindo dessa forma para o processo de transporte. Isso ocorre devido a um aumento no número relativo de dímeros completamente saturados que oferecem níveis similares de oposição ao desacoplamento do ligante quando comparados ao tetrâmero completamente saturado, gerando assim um aumento de forma indireta da proporção dos demais tetrâmeros menos saturados e de menor afinidade pelo ligante em solução. Soma-se a isso um deslocamento do efeito cooperativo para os últimos passos do acoplamento, que também influencia nesse processo.

7. COMPARAÇÃO DO MODELO ESTEQUIOMÉTRICO COM OUTROS MODELOS DE COOPERATIVIDADE.

O acoplamento cooperativo de ligantes a proteínas tem sido estudado de maneira intensa por muitas décadas visando ao entendimento do mecanismo envolvido nesses processos e sua modulação. Para uma melhor compreensão desse fenômeno, vêm sendo propostos e testados no decorrer desses anos muitos modelos teóricos objetivando uma precisa descrição das propriedades das proteínas em solução responsáveis pela ocorrência do caráter cooperativo. A partir da idéia de que uma grande quantidade de dados estruturais, espectroscópicos e cinéticos disponíveis para sistemas cooperativos diversos poderiam ser descritos por um modelo 'relativamente simples', foi sugerido inicialmente uma explicação para esse fenômeno com base no comportamento observado para o acoplamento cooperativo do oxigênio à Hb humana. Assim, considerou-se um modelo de dois estados no qual a Hb existiria em duas formas predominantes de afinidade e de estrutura, uma delas tensa T de baixa afinidade pelo ligante e a outra relaxada R de alta afinidade, tal que o acoplamento cooperativo seria coordenado por constantes definidas para as transições alostéricas de T para R, e por suas respectivas constantes de equilíbrio para o acoplamento do ligante (assumidas serem distintas para cada forma e constantes para qualquer passo do acoplamento do ligante, Monod et al., 1965). A partir da introdução deste conceito, muitos outros modelos semelhantes, tais como a aplicação cinética desta proposta por Henry et al. (1997), o modelo dos três estados (Edelstein, 1996), e outras versões mais anteriores (Koshland et al., 1966; Szabo and Karplus, 1972; Herzfeld and Stanley, 1974), têm sido propostos para Hb humana em um esforço de correlacionar a estrutura, a dinâmica e a energética de agregados protéicos.

Embora esses modelos tivessem a intenção de ampliar os conhecimentos acerca da função das proteínas por meio de uma integração desses três aspectos, os dados cristalográficos necessários para a demonstração direta da presença de espécies $T \in R$ na ausência de oxigênio ou das formas parcialmente oxigenadas são até o momento insuficientes para que as propriedades das Hbs em solução possam ser correlacionadas com as cristalográficas sem equívocos. Dessa forma, torna-se impossível comprovar um determinado modelo com base apenas nas duas estruturas originalmente observada por Perutz et al. (1968) para as formas deoxi (T_0) e completamente oxigenada (R_4) sem perda de coerência com relação a esses três aspectos, conforme discutido abaixo.

O mesmo ocorre quando se considera os dados de difração de raios-X obtidos por Liddington et al. (1988) e os resultados de Rivetti et al. (1993), Mozzarelli et al. (1991) e Shibayama e Saigo (1995) para as formas parcialmente oxigenadas, os quais ao contrário do sugerido por Henry et al. (1997) e Eaton et al. (1999), não dão suporte apenas para o modelo de dois estados para Hb. As condições experimentais nas quais os cristais ou as Hbs encapsuladas são mantidas são tais que transições conformacionais não são possíveis durante o processo de acoplamento do ligante devido às restrições impostas pelos fatores externos. Desde que tais condições podem fornecer ou receber dessas estruturas uma quantidade de energia de tal forma que as estruturas *T* ou *R* são mantidas durante qualquer etapa do acoplamento, este tipo de dado experimental não pode ser atribuído exclusivamente ao modelo de dois estados ou a qualquer outro. O fato do acoplamento do oxigênio não depender do pH no cristal nesses experimentos sugere que as pontes salinas e a estrutura quaternária permanecem inalteradas gerando um acoplamento não cooperativo e confirmando as restrições impostas pelo meio. Por outro lado, Brzozowski (1984) cristalizou Hbs nas quais as cadeias α foram oxigenadas enquanto as cadeias β permaneceram livres, e demonstrou que essas espécies tinham muitas características intermediárias àquelas observadas para as formas *T* e *R*. Estas observações sujeitam o modelo de dois estados e a base estrutural pela qual ele é supostamente válido a mais críticas.

Com o objetivo de correlacionar a estrutura protéica com o comportamento energético de suas espécies, Szabo e Karplus (1972) apresentaram uma descrição termodinâmica para acoplamentos cooperativos na qual a participação de efetores como prótons foi assumida de maneira a levar em conta este e outros efeitos não previstos no modelo original de dois estados. Assim, esses autores sugeriram uma metodologia na qual o número de prótons envolvidos no processo de acoplamento em solução poderia ser diretamente associado ao número de resíduos desprotonados observado a partir de medidas cristalográficas para o processo global de oxigenação. Entretanto, segundo a proposta que aqui se apresenta, espera-se que a proteína em solução encontre uma conformação média com os pK's dos resíduos protéicos oscilando próximo

a um valor estável, o qual depende das condições externas. Tais condições poderiam modificar o estado médio de protonação desses resíduos em solução e o número médio de prótons envolvidos no processo de acoplamento do ligante e desagregação, fazendo com que esse número não necessariamente seja um inteiro, ao contrário do que os outros modelos sugerem.

Um ponto interessante sugerido por Szabo e Karplus (1972) diz respeito ao efeito da força iônica no processo de acoplamento, o qual envolve um fenômeno observado por Antonini (1963) e que permanece obscuro até o momento. Antonini, nessa e em muitas outras publicações, mostrou que para a curva de 50% de saturação para Hb em função do pH, os processos de oxigenação e oxidação mostravam um desvio considerável entre a quantidade de oxigênio ou oxidante necessária para uma saturação de 50% dos sítios na presença de uma perceptível força iônica, mais tarde denominado por ele como o efeito Bohr residual. Em estudos posteriores, Antonini et al. (1963) mostraram ainda que o processo de oxidação poderia conduzir a um aumento no coeficiente de Hill com o aumento do pH, de forma que a intensidade desse aumento dependeria muito do procedimento experimental utilizado, métodos de mistura ou titulação em presença de indicadores à base de corantes e do oxidante utilizado. Essa e outras observações têm tornado difícil a análise dos processos de oxidação e a posterior comparação entre esse mecanismo e aqueles presentes em outros processos. Trabalhos realizados por Bull et al. (1976) sugeriam que a manifestação física do efeito Bohr residual deveria estar associada à introdução de uma carga positiva no átomo de ferro e não a diferenças no mecanismo cooperativo de oxigenação e oxidação. Esse fato foi supostamente demonstrado por meio da introdução de um ânion que se ligava especificamente ao átomo de ferro, consequentemente eliminando o efeito Bohr residual e tornando os processos de oxidação e oxigenação da Hb equivalentes. Szabo e Karplus (1972) não discutem em detalhes o efeito da força iônica e outros parâmetros

importantes, entretanto, baseados nos resultados obtidos por Antonini (1963) para o processo de oxidação, esses autores sugerem que um aumento na força iônica reduz a afinidade pelo oxigênio, aumenta o coeficiente de Hill a 50% de saturação de Hb e reduz o efeito Bohr.

Com base na Eq. 5 e sabendo que o parâmetro α da 'Debye Huckel limiting law' é um número positivo (Sandler, 1999), e que prótons são liberados durante o processo de acoplamento, conclui-se que $v_{\pm i}$ sempre terá um valor positivo, e que um aumento na força iônica irá aumentar a afinidade pelo oxigênio, em contraste com o proposto por Szabo e Karplus (1972). Essas conclusões divergentes surgem devido a um tratamento não apropriado presente na literatura, o qual faz uma correlação fenomenológica direta entre esses dois mecanismos de oxigenação e oxidação (Antonini and Brunori, 1971). Conforme mencionado anteriormente, a somatória que conduz a $v_{\pm j}$ inclui todos os íons envolvidos na reação j. Como a oxigenação não envolve um ligante iônico, é esperada uma redução na energia livre de Gibbs para o acoplamento em valores elevados de μ . Portanto, a proteína poderia expressar o comportamento sugerido por Szabo e Karplus somente em situações nas quais o íon adicionado toma parte nas relações de equilíbrio, mas nesse caso não seria correto associar esse efeito exclusivamente à força iônica. No que diz respeito ao efeito Bohr residual, o simples fato do processo de oxidação envolver uma mudança no número de íons ou na carga das espécies que tomam parte em cada reação (incluídas nos termos $|z_{\pm,j}|$ e $v_{\pm,j}$), pode explicar este fenômeno, assim como a correlação entre este mecanismo e outros como o de oxigenação. Dessa forma, o efeito Bohr residual observado e os resultados obtidos com mudanças no pH e força iônica podem refletir a natureza do ligante usado, o número de espécies iônicas envolvidas, a carga dessas espécies em cada etapa de acoplamento e dissociação e a estequiometria de cada reação, e não somente diferenças na estrutura protéica obtida por meio desses dois mecanismos de acoplamento e oxidação. Consequentemente, a intensidade com que mudanças nas condições externas afetarão cada reação será modulada por ação de massas e restringida pelo efeito do íon comum. A manifestação dessas mudanças nos valores aparentes das energias livres de Gibbs em relação à força iônica (Fig. 2 A) dar-se-á por meio de mudanças distintas nos seus valores para cada grau de saturação sem alterar o formato dessas curvas (Eqs. 5 e 11).

Estudos posteriores realizados por Herzfeld e Stanley (1974) conduziram ao desenvolvimento de um modelo que pode ser considerado uma extensão do modelo de Szabo e Karplus e da teoria de transições conjuntas. Esse modelo foi proposto objetivando explicar efeitos antagônicos, os quais foram assumidos erroneamente não previstos pelo modelo de dois estados, incluir mudanças quaternárias associadas com o acoplamento do ligante, cooperatividade quando nenhuma mudança no nível de agregação das subunidades ocorre e a dependência das propriedades protéicas em relação a força iônica, pH, temperatura e quatro tipos de efetores. A implicação mais impressionante desse modelo é que tais resultados e interações protéicas poderiam ser explicados para a Hb humana com base nos conceitos de mecânica estatística usados para descrever os microestados hipotéticos de cada possível espécie de forma independente e considerando apenas duas conformações terciárias e duas quaternárias. A relevância prática das relações matemáticas propostas é que cada subunidade em um dado estado conformacional é admitida ser composta por subestados hipotéticos independentes nos quais a entrada de ligantes e efetores fornece mudanças na energia total de cada subunidade dadas pelo acoplamento e pelas suas contribuições energéticas devido as variações estruturais terciárias e quaternárias ocasionadas, apesar da interdependência entre tais estruturas (equação 5a, e Eq. A5 em Herzfeld e Stanley, 1974).

No modelo proposto por esses autores, são assumidas interações quaternária-terciária (q-t) e terciária-terciária (t-t), que podem ser afetadas por efetores alostéricos (agindo nas estruturas terciárias (t-efetor) e quaternária (q-efetor)), efetores diretos (os quais interagem diretamente com o ligante ou com seus receptores, efetores de restrição 'constraint effectors' (que modificam as interações q-t e t-t) e por efetores de segunda ordem (interagindo com efetores acoplados e com seus receptores). Tal classificação para explicar as possíveis interações é inadequada e a simples participação desses subtipos de efetores é baseada principalmente em considerações feitas para esse modelo em condições muito específicas. Isso ocorre se for considerado que cada modificação terciária, a qual pode transcender ou não as interações subunidade-subunidade, deve, a princípio, gerar uma estrutura quaternária distinta. Dessa forma, não faz sentido discutir sobre interações do tipo quaternária-terciária mesmo se essas estruturas distintas tiverem uma conformação quaternária similar. Segue que a única relevância de tais similaridades é que essas espécies podem ser expressas por meio de poucos parâmetros que levam em consideração o caráter aparente ou médio dessa coleção de espécies corrigidas de seus respectivos fatores estatísticos. A consideração feita por esses autores de que 2,3-bifosfoglicerato age como um qefetor que acopla preferencialmente à forma deoxi não é facilmente observada de forma a se poder desprezar as demais espécies dependendo das condições externas. Os resultados obtidos para esse efetor e qualquer outro estão também sujeitos a críticas se considerarmos que efetores, tais como prótons, agindo simultaneamente como mais de um dos tipos considerados, não são adequadamente previstos por esse modelo e a estequiometria das reações nas quais os mesmos tomam parte também não é considerada. Em relação aos métodos utilizados para avaliar as mudanças energéticas terciárias nas interações protéicas durante um acoplamento cooperativo, Weber (1984) propôs uma descrição mais interessante e precisa que representa um avanço nessa área. Os resultados obtidos por esse modelo em relação ao nível de agregação das subunidades
(Herzfeld and Stanley, 1974) ignoram as condições externas e são muito superficiais para atingir os níveis de informação propostos. Como consequência, Herzfeld e Stanley concluíram que o grande aumento no grau de dissociação dos tetrâmeros no decorrer da oxigenação seria devido mais à alta afinidade das formas diméricas do que devido à relativamente pequena diferença de estabilidade dos tetrâmeros oxigenados e desoxigenados. Essa conclusão é ambígua, envolve propriedades protéicas que podem variar de acordo com as condições do meio e não é confirmada pelos resultados obtidos e nem pela descrição termodinâmica considerada. Dessa forma, considerando que as diferenças na estabilidade das formas oxi e deoxi é pH-dependente enquanto a afinidade do dímero é virtualmente pH-independente, conclui-se que para um dado pH a diferença aparente entre a estabilidade dessas duas formas pode ser maior ou menor do que aquela inicialmente observada para um determinado pH de referência.

Segue desse fato que cada passo do acoplamento pode ser seguido de um aumento ou de uma redução no estado de agregação, dependendo das condições externas e das modificações estruturais envolvidas nesses passos, as quais definem a interdependência entre as espécies diméricas e as tetraméricas e o comportamento aparente das mesmas. Em vista desse fato não há razão para se questionar se o aumento na dissociação é devido a uma alta afinidade aparente das formas diméricas ou devido a uma baixa afinidade das formas tetraméricas uma vez que essas mudanças no grau de agregação dependem dos estados relativos dessas espécies agregadas e dissociadas. Portanto, considerou-se mais interessante investigar a forma com que estes estados relativos são modificados. Assim, o simples fato de que os estados energéticos das formas tetraméricas oxi e deoxi são pH dependentes, enquanto o mesmo não é observado de maneira conclusiva para as espécies diméricas, mostra que o mecanismo de controle desses processos pode envolver a modulação dos passos de acoplamento do ligante das formas tetraméricas ou da formação de tautômeros para cada condição de pH e não envolvendo portanto, de maneira expressiva, a afinidade do dímero pelo ligante. Em adição, se for considerado que o modelo de Herzfeld e Stanley (1974) pode explicar processos cooperativos sem nenhuma mudança no estado de agregação, pode-se concluir que a metodologia apresentada difere da utilizada aqui, uma vez que tal processo não é possível do ponto de vista físico e matemático, um resultado que pode ser demonstrado usando um diagrama de energia.

A idéia de que o modelo de dois estados não prevê efeitos antagônicos não é correta, uma vez que tal conclusão depende do grau de saturação e de outras condições externas que podem produzir estes efeitos a partir das constantes de equilíbrio global ou médio, discutidas em detalhes posteriormente e no Apêndice B. Dessa forma, considerando-se os parâmetros alostéricos $L'_{T/R}=2,492 \times 10^7$, $\Delta G_T=-5,829 \text{ kcal/mol}$, e $\Delta G_R=-9,054 \text{ kcal/mol}$ a 293 K, as constantes globais de Adair obtidas usando a metodologia sugerida por Ackers e Johnson (1981) fornecerão os valores $\Delta G'_1=$ -6,636 kcal/mol, $\Delta G'_2=$ -6.067 kcal/mol, $\Delta G'_3=$ -5,886 kcal/mol e $\Delta G'_4=$ -7,7122 kcal/mol (valores estatísticos). Esses resultados sugerem um efeito aparente antagônico para os dois primeiros passos do acoplamento, apesar de o coeficiente de Hill expressar valores maiores que um para qualquer grau de saturação e igual a 2,54 a 50% de saturação. A principal conclusão a que se chega é que esse parâmetro reflete o comportamento de um grupo de espécies em solução para cada condição e, por isso, seus valores aparentes não necessariamente expressam as mudanças energéticas envolvidas em cada etapa de acoplamento do ligante. Como consequência, tal análise acerca do fenômeno cooperativo deve ser cuidadosa e concomitante às mudanças energéticas expressas durante cada etapa de acoplamento e grau de saturação.

A proposta de Herzfeld e Stanley (1974), implica em um aumento considerável na dificuldade com que sistemas simples são caracterizados, não justificado pelo nível de

informação obtido. Isso é particularmente observado se for considerado que a teoria da mecânica estatística é estendida para esses sistemas de maneira não totalmente aceitável e com a simples intenção de descrever os microestados protéicos hipotéticos. Em adição, não há um tratamento estatístico adequado que considere o comportamento aparente expresso por esses sistemas de forma a permitir uma análise incisiva da precisão e aplicabilidade desse modelo. Dessa forma, uma correlação direta entre os resultados fornecidos e outros parâmetros macroscópicos (tais como as constantes de Adair) não pode ser feita para cada proteína sem um tratamento estatístico prévio das espécies protéicas com a mesma característica. O modelo proposto por Herzfeld e Stanley é, por sua vez, incapaz de se adequar às suas propostas iniciais desde de que parâmetros macroscópicos importantes não são considerados enquanto uma descrição microscópica detalhada e controversa de outros aspectos é tomada de maneira relevante. O teste utilizado para avaliar a precisão desse modelo e de outras propostas mais recentes é também inadequado para comprovar a aplicabilidade dos mesmos devido ao caráter extremamente superficial dos resultados fornecidos.

Recentemente, foi proposto um modelo cinético para explicar a dependência do tempo em processos de recombinação pareada dos ligantes após foto-dissociação (geminative rebind), e para testar a aplicabilidade do modelo de dois estados nesses processos. Essa contribuição dada por Henry et al. (1997) é para Hbs, mais especificamente para a Hb humana, e não inclui o papel dos prótons de Bohr ou do efeito de íons, limitando desta forma a sua aplicação para condições 'stripped', ou para parâmetros não correlacionados para cada condição experimental de efetores e íons em solução. A análise detalhada desse e dos outros modelos propostos por Szabo e Karplus (1972) e Herzfeld e Stanley (1974) necessita de um entendimento prévio do modelo original de dois estados (Monod et al., 1965). Assim, para demonstrar a inconsistência desses modelos,

optou-se, em um primeiro momento, analisar as consequências da teoria de transições conjuntas adotada e as suas contradições.

Baseando-se nas energias livres de Gibbs das espécies $T_l \ e R_l$ de Hbs na forma tensa e relaxada com *l* ligantes acoplados, respectivamente, Weber (1984) calculou um valor igual a 1,93 para o índice de efeito, indicando que o modelo de dois estados previa uma maior tendência à dissociação nos últimos passos do acoplamento do oxigênio, um comportamento contraditório com o observado para Hbs durante esse processo. Esse resultado foi, no entanto, obtido considerando-se a energia livre de Gibbs para associação da espécie tensa com dois ligantes acoplados, T_2 , igual àquela considerada para a espécie tensa sem ligantes acoplados T_0 , uma consideração imprecisa. Edelstein e Edsall (1986) propuseram a existência de diferentes níveis energéticos para a associação das formas tensas mostrando que, a partir dessas inclusões, o valor para o índice de efeito reduzia-se a 0,3, um resultado compatível com as observações experimentais. A comparação dos procedimentos utilizados por Weber (1982) e aqueles usados por Edelstein e Edsall (1986) mostram uma diferença relevante em relação a este fato e na maneira pela qual esse parâmetro foi obtido por esses autores.

Para acessar as implicações dos diferentes procedimentos utilizados e o comportamento expresso por esse modelo, necessita-se obter as constantes de equilíbrio global e média por meio das quais esses valores para I_{ap} foram obtidos. Para isso, usa-se os conceitos de 'ensemble', que corresponde à completa coleção dos possíveis estados das espécies químicas sujeitas à análise, e de probabilidade de distribuição, que corresponde à fração de espécies no 'ensemble' que têm uma característica particular (Sonntag and Wylen, 1965; Berry et al., 2000). Dessa forma, um sistema contendo muitas espécies protéicas em estados distintos de afinidade e de saturação, com sítios dependentes ou independentes, pode ser caracterizado energeticamente expressando-se o número total de espécies com uma dada característica l, Ψ_l , por meio das propriedades médias obtidas com base nos estados individuais de cada espécie dessa coleção. Assim, para uma mistura composta por n_{T_l} e n_{R_l} , moles de espécies com l ligantes acoplados na forma tensa e relaxada respectivamente, as quais possuem níveis energéticos distintos, a contribuição energética total dada por essas espécies em termos de uma única forma protéica em um estado médio de energia pode ser descrita por n_{P_l} moles dessa espécie tal que $n_{P_l} = n_{T_l} + n_{R_l}$. Nesse caso, a contribuição energética desses dois sistemas para os níveis de energia livre de Gibbs pode ser expressa como segue:

$$n_{P_l} \hat{G}_{P_l} = n_{T_l} G_{T_l} + n_{R_l} G_{R_l}$$
(25)

O que fornece:

$$\hat{G}_{\hat{P}_{l}}^{'} = \frac{n_{T_{l}}}{n_{P_{l}}} G_{T_{l}}^{'} + \frac{n_{R_{l}}}{n_{P_{l}}} G_{R_{l}}^{'} \implies \hat{G}_{\hat{P}_{l}}^{'} = w_{T_{l}} G_{T_{l}}^{'} + w_{R_{l}} G_{R_{l}}^{'}$$
(26)

Os sobrescritos av ou \wedge (como em \hat{G}) são equivalentes e indicam que estes parâmetros representam valores médios (*average*), relativos as espécies com uma dada característica. G' corresponde à energia livre da espécie protéica especificada incluída da sua dependência de efetores (sobrescrito ').

O fator *w* está relacionado à probabilidade de encontrar a espécie em questão, ou ao número relativo de ocorrências dessa espécie. Nesse processo, *w* representa o coeficiente estequiométrico desse equilíbrio hipotético. Usando esse conceito, podemos considerar uma

descrição mais geral para um sistema de equilíbrios interligados contendo um grupo de espécies protéicas P_{i_l} com a característica *l* num estado *i* para obter

$$w_{Pi_{l}} = \frac{[Pi_{l}]}{\sum_{i=1}^{\Psi_{l}} [Pi_{l}]} = \frac{exp(-G_{i_{l}}^{'} / RT)}{\sum_{i=1}^{\Psi_{l}} exp(-G_{i_{l}}^{'} / RT)}$$
(27)

onde R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta e [] denota a concentração.

Assim, a Eq. 26 sugere a seguinte equivalência para as relações de equilíbrio do processo de oxigenação das formas $T \in R$

$$\hat{P}_{l} + L \xleftarrow{av K'_{j}} \hat{P}_{l+1} \equiv w_{T_{l}} T_{l} + w_{R_{l}} R_{l} + L \xleftarrow{av K'_{j}} w_{T_{l+1}} T_{l+1} + w_{R_{l+1}} R_{l+1}$$

A concentração média de cada espécie é dada como segue

$$[\hat{P}_{l}] = [T_{l}]^{w_{T_{l}}} [R_{l}]^{w_{R_{l}}}$$
(28)

Portanto, a constante de equilíbrio média para a oxigenação e, analogamente, para a dissociação das subunidades, pode ser expressa como

$${}^{av}K'{}_{j} = \frac{[T_{l+1}]^{w_{T_{l+1}}} [R_{l+1}]^{w_{R_{l+1}}}}{[T_{l}]^{w_{T_{l}}} [R_{l}]^{w_{R_{l}}} [L]}$$
(29)

e

$$^{av}K'_{D,0} = \frac{\left[D_{0}\right]^{2}}{\left[T_{0}\right]^{w_{T_{0}}}\left[R_{0}\right]^{w_{R_{0}}}}$$
(30)

onde ${}^{av}K'_{j}$ é a constante de oxigenação, a qual corresponde a uma constante média de Adair, e ${}^{av}K'_{D0}$ é a constante média para a dissociação do tetrâmero. Por simplicidade, as constantes para dissociação das espécies em outros estados de saturação não são mostradas.

Essas constantes de equilíbrio para as espécies protéicas com *n* subunidades, assumindo um sítio por subunidade, podem também, ser expressas em termos de constantes estatísticas multiplicando-se cada uma das distintas concentrações intrínsecas das espécies com *l* ligantes acoplados pelo seu respectivo coeficiente binomial $\binom{n}{l}$, (Eq. 15).

A descrição do modelo de dois estados para a oxigenação e associação das subunidades baseada no método proposto por Edsall e Wyman (1958) para uma descrição 'global' destas constantes foi obtida por Ackers e Johnson (1981), e conduz às seguintes relações:

$${}^{g}K'_{j} = \frac{[T_{l+1}] + [R_{l+1}]}{([T_{l}] + [R_{l}])[L]} = \frac{{}^{g}[P_{l+1}]}{{}^{g}[P_{l}][L]} \quad (\text{onde } j=l+1 \text{ e } l=0,1,2,...,n-1)$$
(31)

e

$${}^{g}K'_{D,0} = \frac{\left[D_{0}\right]^{2}}{\left[T_{0}\right] + \left[R_{0}\right]} = \frac{\left[D_{0}\right]^{2}}{{}^{g}\left[P_{0}\right]}$$
(32)

O sobrescrito *g* refere-se ao processo global, com constantes de equilíbrio que são equivalentes no sentido de que ${}^{g}[P_{l}] = [T_{l}] + [R_{l}]$. As constantes de equilíbrio que podem refletir essa igualdade de concentrações entre as descrições macroscópicas e microscópicas nesse método foram sugeridas anteriormente (Edsall and Wyman, 1958) e estão relacionadas com a seguinte relação de equilíbrio:

$${}^{g} P_{l}([T_{l}]+[R_{l}])+L \longleftrightarrow {}^{g} P_{l+1}([T_{l+1}]+[R_{l+1}])$$

A comparação das Eqs. 29 e 30 com as Eqs. 31 e 32 mostra a diferença clara entre as duas metodologias. A equivalência entre essas equações só ocorre em limites extremos, i.e. quando w_T $\rightarrow 0$ ou $w_R \rightarrow 0$. Nesse caso, a diferença entre os níveis energéticos da forma tensa e relaxada não tem um papel significante devido à baixa concentração de uma das formas, e ${}^{g}[P_{l}] = [T_{l}] + [R_{l}] \approx [\hat{P}_{l}] = [T_{l}]^{w_{T_{l}}} [R_{l}]^{w_{R_{l}}}$. Para as outras situações nas quais as espécies tensa e relaxada estão presentes em concentrações significativas, aparecem alguns desvios entre essas duas equações. Dessa forma, se há uma condição externa na qual se observam os mesmos níveis tensa e relaxada, obtém-se ${}^{g}[P_{l}] = 2[T_{l}] = 2[R_{l}]$ e energéticos para as formas $[\hat{P}_{l}] = [T_{l}] = [R_{l}]$. De maneira análoga, a dissociação dessas espécies energeticamente equivalentes (supondo $T_0 \in R_0$ no mesmo nível energético) fornecem ${}^{g}K_{D,0} = D_0^2/2T_0 = D_0^2/2R_0$, e $av K_{D,0}$ igual a $D_0^2/T_0 = D_0^2/R_0$. Essa divergência é bastante razoável, já que as constantes globais de equilíbrio não estão diretamente relacionadas com os estados energéticos de cada espécie presente no sistema, ao passo que as constantes médias baseadas nas Eqs. 29 e 30 estão.

A Fig. 7 A dá uma idéia desse problema quando l=2. Nesse diagrama de energia, existem dois processos possíveis de dissociação para cada tautômero. Um deles produzindo duas espécies diméricas, cada uma com um ligante acoplado (caso *I*), e o outro produzindo um dímero com dois ligantes acoplados e um totalmente desoxigenado (caso *II*). Uma vez que se está interessado em calcular uma constante de equilíbrio média, pode-se resolver esse problema separando-o em dois passos. O primeiro consiste em se calcular a energia livre de Gibbs média para a primeiro caso (${}^{Lav}\Delta G'_{A,2}$) e para o segundo (${}^{ILav}\Delta G'_{A,2}$). Isso pode ser feito considerando-se a contribuição de cada tautômero para os valores de ${}^{qav}\Delta G'_{D,l}$, onde q é igual a I ou II, dependendo do caminho seguido no processo de dissociação. Assim, a seguinte expressão pode ser obtida:

$${}^{qav}\Delta G_{D,l}^{'} = w_{T_{l}} \cdot {}^{q}\Delta G_{D,T_{l}}^{'} + w_{R_{l}} \cdot {}^{q}\Delta G_{D,R_{l}}^{'}$$
(33)

tal que a energia livre de Gibbs para a dissociação dos tautômeros seguindo o caminho q é designada por ${}^{q}\Delta G'_{D}$, adicionando do subscrito correspondente a essa espécie.

Se essa equação é reescrita como uma função das suas constantes de equilíbrio parciais médias (com l=2), as seguintes relações de equilíbrio podem ser obtidas para cada caso:

$${}^{Ia}K'_{D,2} = \frac{\left[D_{1}\right]^{2}}{\left[T_{2}\right]^{w_{T_{2}}}\left[R_{2}\right]^{w_{R_{2}}}} \quad e \qquad {}^{IIa}K'_{A2} = \frac{\left[D_{0}\right]\left[D_{2}\right]}{\left[T_{2}\right]^{w_{T_{2}}}\left[R_{2}\right]^{w_{R_{2}}}}$$
(34)



FIGURA 7. (A) Possíveis rotas energéticas de dissociação do tetrâmero biligado. (B) Níveis de energia livre de Gibbs para os modelos de três estados e (C) para dois estados. Esses modelos foram ajustados com base em dados da literatura para pH=7,4 (Imai and Yonetani, 1975, tabela 1), correspondendo a $\Delta G'_1 = -5,829$, $\Delta G'_2 = -6,258$, $\Delta G'_3 = -6,820$ e $\Delta G'_4 = -9,054$ kcal/mol. As energias de oxigenação para as formas tensas e relaxadas foram consideradas constantes e iguais a $\Delta G'_1$ e $\Delta G'_4$ em pH=7,4 em ambos os modelos.

onde w_{T_l} e w_{R_l} são os pesos relativos das espécies T_l e R_l , que correspondem a $w_{T_l} = [T_l]/([T_l]+[R_l])$ e $w_{R_l} = 1 - w_{T_l}$, respectivamente.

A constante de equilíbrio média, ${}^{a}K'_{D,2}$, pode agora ser calculada para cada situação utilizando-se para isso um procedimento análogo. Dessa forma,

$${}^{a}K'_{D,2} = \frac{([D_{1}]^{2})^{{}^{w_{D_{1}}^{2}}}([D_{0}][D_{2}])^{{}^{w_{D_{0}D_{2}}}}}{[T_{2}]^{{}^{w_{T_{2}}}}[R_{2}]^{{}^{w_{R_{2}}}}}$$
(35)

onde
$$w_{D_1^2} = \frac{[D_1]^2}{[D_1]^2 + [D_0][D_2]}$$
 e $w_{D_0D_2} = 1 - w_{D_1^2}$

Essa expressão média, diferente da global usada anteriormente (Edelstein e Edsall, 1986), está mais correlacionada com a idéia inicial de índice de efeito proposta por Weber (1984) e pode fornecer, de maneira direta, uma função de partição para os casos em que a energia livre de Gibbs para a oxigenação do dímero é distinta para cada passo do acoplamento. Nesses casos, a diferença entre as duas metodologias pode ser mais pronunciada. O uso de uma ou outra descrição deve ser baseado na propriedade analisada e na natureza dos dados experimentais coletados.

O teste utilizado para avaliar quantitativamente essas duas metodologias e checar a validade do modelo de dois estados em respeito à dissociação, acoplamento do ligante, efetores alostéricos e concentração de proteína foi baseado nos resultados obtidos por Chu et al. (1984) para o processo de dissociação e naqueles obtidos por Imai e Yonetani (1975) para a oxigenação. Assim, considerou-se um valor para a constante alostérica $L'_{T/R}$ ($L'_0=[T_0]/[R_0]$) a pH=8,8 e temperatura de 293K igual a 15.000. As energias livres de Gibbs para a oxigenação da forma tensa e relaxada utilizadas foram $\Delta G'_T = -6,67$ kcal/mol e $\Delta G'_R = -9,16$ kcal/mol, respectivamente.

Para a dissociação da espécie T_0 nessas condições, utilizou-se um valor de $\Delta G_{D,T_0}^{'}$ = +12,63 kcal/mol (Fig. 4 B inclusão) enquanto que para a oxigenação das formas diméricas foi considerado um valor igual a -8,4 kcal/mol. Para estender a análise desse modelo, incluiu-se uma dependência com o pH para os parâmetros $L'_{T/R}$ e $\Delta G_{D,T_0}^{'}$.

O fato de o modelo de dois estados não levar em consideração a participação de prótons poderia, em princípio, gerar algumas dúvidas acerca de como tal inclusão poderia ser feita. Entretanto, lembrando que as formas tensa e relaxada possuem afinidades distintas mas iguais durante qualquer passo do acoplamento, e que a única distinção energética entre essas espécies é dada pelo número de ligantes acoplados é natural considerar que esses processos ocorrem sem a participação de prótons, uma vez que a estrutura quaternária é mantida intacta. Segue que a liberação ou captação de prótons em tais modelos deve estar correlacionada com transições entre os tautômeros $T \in R$ (Henry et al., 1997), e com o processo de dissociação (Chu et al., 1984). A participação de outros efetores em resíduos mais suscetíveis, tais como prótons pertencentes à classe F_0 , pode aumentar a dependência dessas transições em relação ao pH, porém, esta classe não foi considerada aqui. Desde que uma especificação detalhada dos resíduos envolvidos nesses processos não é necessária, as seguintes relações de equilíbrio poderiam ser obtidas para o modelo de dois estados a uma dada condição de pH:

$$T_{0} \xleftarrow{K_{T_{0}R_{0}}}{R_{0}} \rightarrow R_{0} + v_{B}H^{+} \qquad \Delta G_{T_{0}R_{0}}^{'}(pH) = \Delta G_{T_{0}R_{0}} - 2.303v_{B}RTpH$$
(36)

$$T_{0} \xleftarrow{K_{D,T_{0}}}{2} 2D_{0} + v_{D,T_{0}} H^{+} \Delta G_{D,T_{0}}^{'} (pH) = \Delta G_{D,T_{0}} - 2.303 v_{D,T_{0}} RTpH$$
(37)

A partir dos resultados obtidos por Imai e Yonetani (1975), em que $L'_{T/R} = 15.000$, pode-se calcular $\Delta G'_{T_0R_0} (pH8,8) = +5,6$ kcal/mol, assumindo-se $v_B = +2,3$ (o número de prótons envolvidos nesse processo para a faixa fisiológica de pH varia entre +1,8 a +2,7, dependendo da referência adotada) e substituindo esses valores na Eq. 36 a pH=8,8, obtém-se $\Delta G_{T_0R_0} = +32,74$ kcal/mol. Desde que $\Delta G_{T_0R_0} é$ independente do pH, os valores de $\Delta G'_{T_0R_0} (pH)$ para outras condições podem ser obtidos mudando-se o pH na Eq. 36. Para o processo de dissociação, um procedimento análogo foi utilizado. Nesse caso, considerou-se os valores estimados a partir da inclusão na Fig. 4 B onde $\mathcal{V}_{D,T_0} = +1,0$ e $\Delta G'_{D,T_0} = +12,63$ kcal/mol a pH=8,8, o que resultou em um valor de $\Delta G_{D,T_0} = +24,43$ kcal/mol (Eq. 37). A concentração inicial de proteína considerada para a espécie tensa deoxi foi 35 μ M.

Optou-se por fazer esses ajustes iniciais para os dados obtidos por Imai e Yonetani (1975) a pH=8,8 por ser bem aceito que nessas condições o modelo de dois estados fornece uma descrição adequada dos resultados experimentais (Eaton et al., 1999; Henry et al., 1997; Sawick and Gibson, 1976). Dessa forma, Sawick e Gibson (1976), com base em observações cinéticas da reassociação de CO à Hb após foto-dissociação em pH abaixo de 8,0, concluíram que esse modelo se mostrava inadequado para tais condições. Esses autores também mostraram que nessas condições o ligante e o pH têm um papel efetivo nas transições estruturais.

A Fig. 8 A mostra os resultados previstos em relação aos valores intrínsecos de $\Delta G'_{D,T0}$ para a descrição global e média, obtidos a partir dos ajustes iniciais feitos anteriormente, e para os resultados obtidos por Chu et al. (1984) nas mesmas condições. Para o cálculo destes parâmetros, os dados provenientes das Eqs. 36 e 37 foram utilizados para construir a distribuição de espécies para cada condição de maneira similar àquela mostrada na Fig. 8 B para os ajustes iniciais. A partir desses resultados, as Eqs. 30 e 32 foram utilizadas para calcular os parâmetros médios e globais para a dissociação do tetrâmero deoxi. As energias de dissociação das espécies em outros níveis de saturação foram obtidas por meio de equações análogas. A exceção é a energia livre global de dissociação da espécie com dois ligantes acoplados, que foi obtida conforme proposto por Edelstein e Edsall (1986), ao passo que os valores médios foram obtidos segundo a Eq. 35.

Conforme mostrado na Fig. 8 A, há uma pequena diferença entre os procedimentos médios e globais; no entanto, tais diferenças podem ser significativas dependendo da propriedade analisada e das condições externas. O comportamento previsto pelo modelo de dois estados observado nessa figura mostra um claro desvio dos resultados obtidos por Chu et al. (1984), mesmo a pH=8,8, apesar de ambos conduzirem a uma curva de saturação virtualmente idêntica nesse valor de pH (Fig. 8 A inclusão). Segue desses resultados que as energias livres de dissociação previstas por esse modelo para as espécies com três e quatro ligantes acoplados apresenta diferenças quantitativas e qualitativas, sendo a dissociação da espécie com três ligantes menos espontânea que a da espécie com quatro.



FIGURA 8. (A) Influência do pH na energia livre de dissociação da Hb humana prevista para o modelo de dois estados pelos procedimentos médio (símbolos fechados) e global (símbolos abertos) conforme descrito no texto, e com base nas Eqs. 27-30 e 33. Para esses cálculos consideramos os mesmos ajustes iniciais descritos na Fig. 6 A. A constante de equilíbrio de dissociação global foi calculada como sugerido por Edelstein e Edsall (1986). Os dados experimentais foram baseados nas tabelas 3 and 4, de Chu et al. (1984). (**Inclusão**) Gráfico de log (Y/(1-Y)) versus log (pO_2) baseados nos ajustes iniciais descritos na Fig. 6 A para o modelo de dois estados a pH=8,8. Para o modelo Stc, os parâmetros foram obtidos para esse valor de pH como descrito na Fig. 2 B. Os dados experimentais foram obtidos por meio das constantes de equilíbrio na Tabela 1 de Imai e Yonetani (1975).

A Fig. 8 B mostra a distribuição de espécies para a condição de referência a pH=8,8, para uma concentração inicial de proteína de 35 µM. Os resultados mostrados nessa figura foram obtidos a 293 K e incluem a contribuição estatística de cada isômero dada pela Eq. 15. A Fig. 5 A, obtida com o modelo Stc para uma saturação de Hb de 50% nas mesmas condições experimentais, mostra claramente as diferenças quantitativas em comparação com o modelo de dois estados para o mesmo grau de saturação e pH (Fig. 8 B). Conclui-se assim que o modelo dos dois estados prevê, a 50% de saturação, cerca de 20% de dímeros, ao passo que segundo o modelo Stc esse valor é de aproximadamente 5%. Essa discrepância é bastante razoável se considerarmos que os dois modelos descrevem praticamente a mesma curva de saturação e que tais diferenças refletem predominantemente o mecanismo de cooperatividade adotado.

O comportamento previsto para o modelo de dois estados em relação às curvas de diluição em ausência de deriva conformacional não é mostrado, mas pode ser analisado qualitativamente a partir da Fig. 8 A. Dessa forma, para *Y*=0 pode-se concluir que a extensão logarítmica da curva de diluição permanece constante e em concordância com os resultados obtidos anteriormente pelo modelo Stc até valores de pH igual a 10,75. Para soluções mais básicas ocorrem diferenças significativas. As razões para tal comportamento podem ser entendidas se considerarmos que há uma dada condição de pH na qual a energia livre de dissociação da espécie deoxi alcança um valor mínimo, e que o aumento do pH a partir desse valor aumenta a dissociação. O mesmo pode ser observado para as demais formas com números distintos de ligantes acoplados. Isso ocorre devido à dependência distinta com o pH do processo de dissociação e das transições *T-R*. Para o modelo de dois estados, esse valor



FIGURA 8. (**B**) Distribuição das formas de Hb em função do número médio ($\langle n \rangle$) de moles de ligante acoplado por mol de Hb humana de acordo com o modelo de dois estados em pH 8,8, e com os ajustes iniciais descritos na Fig. 6 A. **Inclusão**, Escalas expandidas da distribuição das formas de Hb.

mínimo alcançado para a energia livre de dissociação da espécie deoxi ocorre a pH \approx 10,75. A Fig. 8 A também mostra que para outros graus de saturação (por exemplo, *Y*=0,6), são esperados desvios significativos dos resultados experimentais. A Fig. 8 C fornece uma análise mais incisiva do comportamento previsto por esse modelo em várias condições. Os resultados obtidos para o índice de efeito são mostrados para as constantes de dissociação estatísticas e intrínsecas aplicadas na Eq. 21 para o caso global e também para as constantes médias. Para os resultados mostrados na Fig. 8 C inclusão (esquerda), considerou-se a mesma concentração de proteína, número de prótons e temperatura usadas até então. Na inclusão a direita dessa figura, os resultados foram obtidos substituindo-se as Eqs. 29 e 31 na Eq. 18 para as descrições médias e globais para cada condição de pH.

Para valores de pH menores que 7,0, o índice de efeito calculado a partir das constantes intrínsecas foi $I_{ap}=1$ para as descrições médias e globais enquanto que para a constante estatística, $I_{ap} \approx 1,2$. A Fig. 8 C, inclusão esquerda, mostra um processo cooperativo nestas condições (Hc=2a 50% de saturação) para o caso intrínseco e $Hc\approx1,2$ para o estatístico. A inclusão à direita na Fig. 8 C mostra que para esta faixa de pH, $\Lambda_{ap}=0$ tanto para a situação média quanto para a global, de tal forma que a cooperatividade é máxima a 50% de saturação nestes casos. A conclusão geral para esta faixa de pH é que este modelo prevê um reduzido processo cooperativo com a mesma tendência à dissociação durante os primeiros e os últimos passos do acoplamento para as constantes intrínsecas, enquanto que para as estatísticas este modelo prevê um processo cooperativo com uma tendência a se dissociar durante os últimos passos do acoplamento. Os resultados obtidos



FIGURA 8. (C) Influência do pH no índice de efeito da Hb para o procedimento médio e global com base nas mesmas condições de ajuste iniciais para o modelo de dois estados descritas na Fig. 6 A, e usando as equações mencionadas na Fig. 6 B para os casos intrínsecos e estatísticos. **Inclusão (esquerda)** Efeito de pH na dependência do coeficiente de Hill da Hb a 50% de saturação para valores intrínsecos e estatísticos. **Inclusão (direita)** Efeito de pH na assimetria aparente da Hb com base nos procedimentos médio e global.

para *Hc* com base no modelo Stc e nos resultados experimentais, quando comparados com os fornecidos pelo modelo do dois estados nas mesmas condições, mostram grandes desvios para os valores estatísticos (Fig. 3 A), para os resultados intrínsecos e estatísticos de I_{ap} , e para Λ_{ap} (Fig. 4 A e B). Dessa forma, para essas condições, os resultados teóricos obtidos por esse modelo foram quantitativamente e qualitativamente inconsistentes com as propriedades de Hbs.

A análise do comportamento esperado para valores de pH entre 7 e ~9 mostrou uma redução em I_{ap} com o aumento do pH para os casos intrínsecos e estatístico ($I_{ap} \approx 0.05$ a pH=9,0; Fig. 8 C). O *Hc* nessas condições mostrou um valor máximo de *Hc*=3,5 para as constantes intrínsecas, enquanto um aumento nesse parâmetro foi observado até *Hc*≈2,5 para os resultados estatísticos (Fig. 8 C, inclusão esquerda), indicando um processo cooperativo com uma tendência mais marcante à dissociação nos primeiros passos do acoplamento. A partir da Fig. 8 C, inclusão direita, conclui-se que a cooperatividade é mais pronunciada nos últimos passos do acoplamento para essa faixa de pH. Com base nesses resultados, e considerando os valores experimentais obtidos com o modelo Stc nas mesmas condições mostra-se que, apesar do bom ajuste obtido a partir das curvas de saturação, Fig. 8 A inclusão, o modelo de dois estados não fornece uma descrição correta das propriedades de Hbs, mesmo se for considerada uma faixa mais favorável de pH para a aplicação do mesmo.

Essa conclusão se torna mais convincente se considerarmos valores de pH maiores que 9. Nesse caso, há uma inversão no caráter assimétrico e uma subsequente estabilização na $\Lambda_{ap}=0$ para pH \geq 11 (Fig. 8 C inclusão direita). Uma análise do *Hc* mostra uma redução e estabilização nesse parâmetro para os valores intrínsecos (*Hc*=2) enquanto para o caso estatístico (*Hc*=1) a pH \geq 11 essas condições predizem um acoplamento aparentemente simples (Fig. 8 C, inclusão b). Pode-se concluir que o comportamento anômalo previsto por esse modelo para as curvas de diluição a pH \ge 10,75 ocorre mais intensamente a graus intermediários de saturação pelo ligante e para uma faixa mais larga de pH, se considerarmos os valores de índice de efeito para a descrição global e média. Assim, o valor de $I_{ap} \ge 1$ entre pH 10,3 e 12 indica que há uma aproximação com um posterior cruzamento dos valores de $\Delta G'_{D,I}$ para as espécies com 0 e 2 ligantes, com uma subsequente perda de cooperatividade e assimetria de acoplamento, uma conclusão outra vez completamente diferente das medidas experimentais (Fig. 8). Em valores de pH maiores, não há previsão de cooperatividade ou tendência à dissociação após o acoplamento do ligante.

Um outro ponto que tem sido discutido recentemente (Ackers, 2000; Edelstein, 1996; Ackers, 1984) diz respeito à necessidade de incluir um terceiro estado híbrido no esquema original de dois estados. A necessidade de pelo menos três estados de afinidade para descrever o acoplamento do ligante à Hb humana foi primeiramente observada por Minton e Imai (1974). De acordo com seus resultados, seria impossível para um modelo de dois estados contemplar as variações para o parâmetro alostérico *c* quando ocorrem mudanças na concentração de efetores alostéricos, tais como prótons, ou na força iônica. Outros resultados obtidos por Smith e Ackers (1985) usando complexos de cianeto para oxidar Hbs mostraram uma alta cooperatividade durante o acoplamento do ligante ao estado *T*, conduzindo esses autores a conclusões similares no que diz respeito à inadequação do modelo de dois estados.

Em contraste, Edelstein (1996) concluiu que o modelo de três estados não forneceria resultados mais satisfatórios que aqueles obtidos por meio da proposta original de dois estados. O terceiro estado considerado por Edelstein (1996) consistia de um estado H híbrido de energia intermediária, com uma estrutura descrita como um dímero $\alpha\beta$ tenso associado com um dímero

αβ relaxado, e com as correspondentes energias de oxigenação para os estados *T* e *R*, respectivamente (Fig. 7 B). A consequência dessas propriedades é a prevalência das espécies H_{2r} , i.e., *H* com dois ligantes acoplados na porção relaxada dessa molécula, em relação às outras possíveis espécies com dois ligantes acoplados. O próximo O₂ a ser acoplado poderia dar origem predominantemente à espécie H_{2r1t} , mas a alta afinidade da espécie R_3 sugere a sua prevalência em relação à H_{2r1t} . As simulações conduzidas por Edelstein (1996) resultaram em uma redução nos valores de H_c a 50% de saturação quando o terceiro estado foi incorporado neste sistema, o que permitiu a esse autor demonstrar que o modelo de dois estados era mais preciso e mais simples. Tais resultados são, no entanto, muito dependentes das constantes alostéricas *L* adotadas para as transições *T*-*H* e *H*-*R*. Para demonstrar tal dependência e o comportamento expresso quando outros estados são incluídos no modelo de dois estados, optou-se por se realizar um teste com ajustes iniciais distintos daquele utilizado por Edelstein e a um valor de pH mais reduzido do que o considerado anteriormente nessa dissertação, de forma a testar o comportamento desses modelos em pH fisiológico.

Examinou-se ainda neste teste, o comportamento expresso pelas constantes médias de oxigenação para esses dois modelos (Eq. 27), assim como a sua assimetria e coeficientes de Hill, com base nos resultados obtidos por Imai e Yonetani (1975). O processo de dissociação não foi considerado nessa simulação. Para o modelo de três estados, optou-se por se ajustar as relações energéticas entre esses tautômeros de maneira a satisfazerem os quatro níveis energéticos obtidos por Imai e Yonetani a pH 7,4 (Fig. 7 B). Dessa forma, foi considerado $\Delta G_T = \Delta G'_I = -5,829$ kcal/mol, $\Delta G'_2 = -6,258$ kcal/mol, $\Delta G'_3 = -6,820$ kcal/mol e $\Delta G'_4 = \Delta G_R = -9,054$ kcal/mol e foram ajustados os parâmetros alostéricos para as formas *H* e *R* respectivamente, $L'_{T/H}$ e $L'_{H/R}$, para satisfazer as mudanças energéticas para o segundo e terceiro passos do acoplamento (Fig. 7 B).

Isso resultou num valor de $L'_{T/H}= 3,091 \times 10^4$ e $L'_{H/R}= 4,637 \times 10^1$. Em vista da impossibilidade de satisfazer todos esses níveis para o modelo de dois estados, assumiu-se que as mudanças energéticas para o primeiro e o quarto passo da oxigenação iguais às obtidas por Imai e Yonetani a pH 7,4, tal que $\Delta G_T = \Delta G'_1 = -5,829$ kcal/mol e $\Delta G_R = \Delta G'_4 = -9,054$ kcal/mol. Para o terceiro passo obtido por Imai e Yonetani, as relações energéticas entre os tautômeros $T \in R$ foram ajustadas para satisfazer o valor de $\Delta G'_3 = -6,820$ kcal/mol obtidos por estes autores para esse passo da oxigenação (Fig. 7 C), o que fornece $L'_{T/R} = 2,995 \times 10^6$. A constante de equilíbrio média para a oxigenação, ^{*av*} K'_j , baseada na contribuição de cada tautômero para a energia média livre de Gibbs total dessa coleção, ^{*av*} $\Delta G'_j$, pode ser obtida considerando a Eq. 31 e os seguintes equilíbrios

$$T_l + O_2 \xleftarrow{T_{lK_j}} T_{l+1} \qquad R_l + O_2 \xleftarrow{R_{lK_j}} R_{l+1} \qquad e \qquad H_l + O_2 \xleftarrow{H_{lK_j}} H_{l+1}$$

Aqui, por simplicidade, não especificamos as oxigenações possíveis e distintas da espécie H. Os valores de ${}^{av}\Delta G'_{i}$ podem ser, então, obtidos para esse equilíbrio como segue:

$${}^{av}\Delta G_{j}^{'} = w_{T_{j}}G_{T_{j}}^{'} + w_{R_{j}}G_{R_{j}}^{'} + \sum_{m=1}^{\Phi_{j}} {}^{m}w_{H_{j}}{}^{m}G_{H_{j}}^{'} - w_{T_{j-1}}G_{T_{j-1}}^{'} - w_{R_{j-1}}G_{R_{j-1}}^{'} - \sum_{m=1}^{\Phi_{j-1}} {}^{m}w_{H_{j-1}}{}^{m}G_{H_{j-1}}^{'}$$
(38)

onde $\Phi_{j/j-1}$ é o número total de possíveis espécies *H* com *j* ou *j*-1 ligantes acoplados. *m* designa cada uma dessas espécies.

Uma vez que estamos interessados em analisar as mudanças energéticas entre essas espécies, pode-se assumir um valor de $G_{To} = 0$ como o estado de referência para esta espécie. Considerando as respectivas energias livres para as transições tautoméricas das espécies desoxigenadas, $\Delta G'_{T_{OHO}}$ e $\Delta G'_{H_{ORO}}$, assim como as energias livres de Gibbs de oxigenação das formas tensa, ΔG_T , e das formas relaxadas, ΔG_R , obtém-se

$$G_{T_{l}} = l\Delta G_{T}$$
, $G'_{H_{s\,t+p\,r}} = \Delta G'_{T_{0}H_{0}} + s\Delta G_{T} + p\Delta G_{R}$ e $G'_{R_{l}} = \Delta G'_{T_{0}H_{0}} + \Delta G'_{H_{0}R_{0}} + l\Delta G_{R}$

onde *s* e *p* indicam o número de moléculas de oxigênio acopladas ao dímero tenso e relaxado da espécie *H*, respectivamente.

Se considerarmos que o número total de prótons liberados durante o acoplamento das moléculas de oxigênio a Hb, os prótons de Bohr, estão envolvidos na transição T-R, o fato de as espécies H possuírem metade das subunidades na forma tensa e a outra na forma relaxada sugere que metade desses prótons poderia, por sua vez, estar presente nas transições de T para H, enquanto que a outra metade estaria envolvida na transição de H para R. Dessa forma, em um dado pH, o seguinte equilíbrio pode ser observado:

$$T_{0} \xleftarrow{K_{T_{0}R_{0}}}{H_{0} + \upsilon_{B/2} H^{+}} \qquad \Delta G_{T_{0}H_{0}}^{'} (pH) = \Delta G_{T_{0}H_{0}}^{'} -2,303\upsilon_{B/2} RTpH$$
(39)

e

$$H_{0} \xleftarrow{K_{H_{0}R_{0}}}{R_{0} + \upsilon_{B/2}H^{+}} \qquad \Delta G_{H_{0}R_{0}}^{'}(pH) = \Delta G_{H_{0}R_{0}} - 2,303\upsilon_{B/2}RTpH$$
(40)

onde $v_{B/2}$ diz respeito à metade dos prótons de Bohr, o qual foi assumido ser igual a 1,15. Para o modelo de dois estados, as reações são similares, porém, sem a presença do estado *H* e com a participação de 2,3 prótons de Bohr nas transições *T-R* (Imai and Yonetani, 1975), conforme assumido para o primeiro teste, Eq. 34.

Os valores para $\Delta G'_{TOHo} \in \Delta G'_{HORo}$ a pH 7,4 podem ser obtidos para o modelo dos três estados a partir dos parâmetros alostéricos $L'_{T/H} \in L'_{H/R}$ calculados anteriormente e resultam em $\Delta G'_{TOHo} = +6,020 \in \Delta G'_{HORo} = +2,234$ kcal/mol, enquanto para o modelo dos dois estados o parâmetro $L'_{T/R}$ fornece $\Delta G'_{TORo} = +8,683$ kcal/mol. A partir das Eqs. 39, 40 e 36, os valores calculados para ΔG_{TOHo} , $\Delta G_{HORo} \in \Delta G_{TORo}$ foram +13,645, +17,431 e +31,5 kcal/mol, respectivamente. Os resultados previstos por esses modelos para tais mudanças energéticas, aparentes, a outros valores de pH, foram analisados com base na descrição termodinâmica desenvolvida anteriormente.

A Fig. 9 mostra os resultados obtidos com base nestes modelos para os valores intrínsecos de $log {}^{a}K'_{j}$ com base na Eq. 30. Observa-se um nítido desvio dos dados experimentais para ambos os modelos; porém, conforme sugerido anteriormente (Minton and Imai, 1974; Imai and Yonetani, 1975), um modelo de três estados de fato fornece uma melhor descrição das constantes de equilíbrio, mas apenas para uma estreita faixa de pH (tomando o pH 7,4 como o valor de referência).

Os valores previstos para $log P_{50}$ para a Hb humana com base nesses modelos podem ser observados na Fig. 2 B, que mostra desvios significativos dos dados experimentais



FIGURA 9. Logaritmo das constantes aparentes de oxigenação como função do pH para os modelos de três estados (símbolo cruzado) e dois estados (símbolos abertos) calculados usando um procedimento global e a Eq. 11 para cada condição de pH. Os dados experimentais (símbolos fechados) foram baseados na Tabela 1 de Imai and Yonetani (1975).

também com respeito a esse parâmetro. Assim, a inclusão de um terceiro estado não é suficiente para tornar esse modelo coerente, mas um modelo de dois estados parece ainda mais inadequado. Isso se torna mais convincente com a análise de outros parâmetros, tais como H_c a 50% de saturação por oxigênio (Fig. 3 A). Os modelos clássicos mostram grandes discrepâncias em valores de pH diferentes de 7,3 e 9,0, principalmente devido à ação de massas de prótons, que modifica os estados energéticos dos tautômeros. Segue que um aumento no pH favorece a predominância de espécies tautoméricas em estados mais reduzidos de protonação (as formas R), com os passos de oxigenação ocorrendo de R_0 a R_4 , tal que H_c tende à unidade. Similarmente, em baixos valores de pH, a forma T predomina, com uma tendência à oxigenação através das formas T_0 a T_4 (Fig. 3). A pH 7,4 – 8,0, ocorre um aumento no H_c , novamente contradizendo os dados experimentais. A inclusão desse estado não resolve convenientemente o problema, mas reduz a distorção observada devido a uma maior flexibilidade energética. A pH 7,4 ocorreu um aumento no H_c quando o terceiro estado foi incluído, em contraste com os resultados obtidos por Edelstein (1996), Fig. 3 A. O H_c a distintos números médios de saturação para estes modelos é mostrado na Fig. 3 B, que mostra de maneira mais detalhada as diversas discordâncias apresentadas.

A Fig. 4 A ilustra o parâmetro de assimetria para os ajustes feitos. Em ambos os modelos houve uma redução na assimetria em valores de pH diferente de 7,0. O comportamento de ambas as curvas foi completamente diferente dos dados experimentais, incluindo a previsão de uma inversão na assimetria a pH 8,0. A discrepância do modelo de dois estados foi consideravelmente maior para quase todos os valores de pH.

Com base nas considerações anteriores acerca da teoria de transições conjuntas, é possível agora analisar o modelo cinético proposto por Henry et al. (1997) e mostrar os motivos pelos quais não o consideramos válido. Para entender as razões que levaram esses autores a desenvolver essa nova descrição termodinâmica e a razão pela qual novas espécies são consideradas em equilíbrio, é necessário o conhecimento de investigações anteriores. Experimentos conduzidos por Gibson (1959), em relação a processos de reassociação do *CO* à Hb após foto-dissociação mostraram uma alta taxa de reassociação do ligante para a condição de escuro (dark condition) para altos valores de pH quando comparada a meios mais ácidos. Esse

autor interpretou esses resultados como consequência da formação de uma espécie altamente reativa, *Hb**, correspondente a uma molécula que perdeu o seu ligante por um curto intervalo de tempo e que não teve possibilidade de alterar a estrutura do sítio para a forma deoxi. Baseando-se em observações em diferentes valores de pH, Gibson concluiu que o aumento no pH leva a uma maior formação dessas espécies em solução. A partir de parâmetros experimentais obtidos em uma escala de micro segundos, sugeriu-se uma possível inviabilidade do modelo proposto por George e Pauling (1949, 1951), que considerava que os sítios protéicos não estavam inicialmente expostos na superfície da proteína e que cada acoplamento do ligante reduziria a barreira estérica a ser transposta pelo próximo acoplamento, gerando assim o fenômeno cooperativo, uma hipótese que o número e a intensidade das taxas obtidas por Gibson pareciam não confirmar. Esse fato foi visto por Henry et al. (1997) e Eaton et al. (1999) como uma demonstração irrefutável da inaplicabilidade desse tipo de modelo e, consequentemente, da aplicabilidade de teoria de transições conjuntas e da proposta de dois estados.

Experimentos posteriores realizados a níveis parciais de foto-dissociação também na escala de tempo de micro segundos (Sawicki and Gibson, 1975) conduziram à observação de uma nova espécie química com afinidade pelo ligante distinta das obtidas até então, mostrando, neste caso inconsistências com o modelo de dois estados. A presença dessa nova espécie em solução foi na época associada a valores de pH abaixo de 8 e também ao efeito de inositol hexafosfato. Em vista da observação dessa nova espécie e da consequente contradição com o modelo de dois estados, Henry et al. (1997) e Eaton et al. (1999), com base em trabalhos anteriores a esses citados, concluíram que a escala de tempo utilizada não era adequada. Essa conclusão refletia em parte o avanço tecnológico obtido por meio dos equipamentos de espectroscopia resolvida no tempo usando lasers com escala de tempo de nano e pico segundos. Aplicando essa escala de

tempo, vários autores observaram cinco taxas de reação distintas, embora esse número pudesse ser reduzido, dependendo das condições externas. Em um primeiro momento, a ocorrência desse número de taxas de reação poderia servir para descartar a proposta do modelo de dois estados, uma vez que um grande número de espécies com distintas afinidades pelo ligante poderia estar presente em solução, no entanto, segundo esses autores, esse não seria o caso.

Com base nos resultados obtidos por Hopfield et al. (1971) indicando que a forma Hb^* observada por Gibson poderia ser identificada com as espécies na estrutura quaternária R, e nos resultados obtidos por Hofrichter et al. (1983), Murray (1987) e Hagen et al. (1995, 1996) indicando a existência de espécies com relaxação terciária da subunidade, Henry et al. (1997) e Eaton et al. (1999) propuseram que as duas taxas mais rápidas observadas durante as medidas cinéticas estariam relacionadas com o reacoplamento pareado das subunidades da estrutura quaternária R a qual possuiria estruturas terciárias r^* e r, e a transições terciárias ocorrendo entre essas subunidades via relaxação terciária. A terceira taxa foi associada com a transição quaternária de R para T e as duas taxas restantes, com a taxa bimolecular de associação do ligante às formas R e T.

O modelo proposto por Henry et al. (1997), assim, assume que as subunidades relacionadas à forma R existem em duas estruturas terciárias distintas e interconvertíveis, $r^* e r$, e que cada uma dessas estruturas tem três possíveis estados de interação com o ligante, r, $r \cdot x e rx$, onde x representa o ligante e $r \cdot x$ designa a espécie com o ligante próximo ao sítio, mas não acoplado. A Fig. 10, setas pretas, mostra a idéia principal envolvida nesse modelo. Por simplicidade, essa figura mostra apenas as possíveis reações envolvidas em uma hipotética liberação ou captura de ligantes. Os estados intermediários seguem a mesma idéia. Nesse modelo, a subunidade no estado T também pode apresentar relaxação terciária, mas esse processo só é

considerado após uma prévia caracterização experimental. Henry et al. (1997) assumem que inicialmente as subunidades estão virtualmente no estado r^*x , e que o processo de fotodissociação forma, no início, preferencialmente as espécies $r^* \bullet x$, e que transições quaternárias ocorrem apenas entre as espécies com o mesmo número de ligantes. Considerando-se o diagrama de energia na Fig. 7 C, pelo menos um passo ascendente é necessário para obter uma espécie R_{j-1} a partir de uma R_j . Tomando-se em consideração agora o grande número de espécies intermediárias possíveis que podem expressar níveis energéticos similares mas que possuem números distintos de ligantes acoplados quando os estados e subestados propostos por Henry e colaboradores são adicionados, conclui-se que a consideração feita por esses autores em respeito à exclusiva formação inicial de espécies $r_s^* \bullet x_s$ por foto-dissociação é inadequada, pois muitas outras vias podem surgir para cada grau de saturação pelo ligante e para cada condição externa em que estas transições ocorrem.

Foto dissociação





Condição de escuro: Retorno de acordo com o modelo Stc.

FIGURE 10. Esquema do processo de foto-dissociação de acordo com Henry et al. (1997) (setas pretas) e de acordo com o modelo Stc (setas verdes). No primeiro mecanismo, inicialmente as espécies são consideradas na forma quaternária R com conformação terciária da subunidade r^* . Assume-se que o processo de foto-dissociação leva a espécie $r^{*\bullet} x$, correspondentes a uma estrutura terciária r^* com o ligante próximo mas não ligado ao sítio da proteína em cada subunidade ligante. Seguindo esse processo, as outras possíveis espécies são produzidas considerando as restrições descritas no texto. O subscrito s na forma $r^*_{s}r_{4-s}$ designa o número de subunidades não ligadas na estrutura terciária r^* . As etapas intermediárias de dissociação do ligante seguem a mesma idéia, e é assumido que a transição de R para T gera apenas a estrutura terciária t, independente do número de conformações terciárias $r^* e r$ da forma R. Para o modelo Stc, o processo de foto-dissociação é análogo ao processo de desoxigenação para a análise do estado estacionário, e pode ser coordenado por ação de massas. As taxas de associação-dissociação expressas por esse mecanismo podem envolver uma ordem maior devido à taxa bimolecular de acoplamento do ligante e o envolvimento de efetores como prótons e uréia. Por razões similares, acredita-se que a simplificação adotada, de transições quaternárias ocorrendo apenas entre as espécies com o mesmo número de ligantes acoplados, não é coerente, pois o processo de dissociação do ligante não é espontâneo e pode ocorrer termodinamicamente pela via mais apta, o que inclui, por exemplo, a rota $R_2 \rightarrow T_1 \rightarrow R_1$ (Fig. 7 C) ou qualquer outra gerada pela inclusão das espécies propostas ou por meio de mudanças externas.

Assume-se que a conformação da subunidade não depende do acoplamento do ligante e, ao mesmo tempo, considera-se que a taxa de conversão para $r^*x \rightarrow rx$ é instantânea e irreversível, que $r^{*\bullet}x \rightarrow r^{\bullet}x$ é idêntica à $r^{*} \rightarrow r$ e, analogamente, $r^{\bullet}x \rightarrow r^{*\bullet}x$ é idêntica à $r \rightarrow r^{*}$ (Fig. 10). Essa última consideração parece contradizer a primeira se considerarmos que o ligante não tem efeito em qualquer das estruturas, terciária ou quaternária, e que transições podem ocorrer independente da sua presença. Nesse caso, poder-se-ia esperar que $r^* \leftrightarrow r = r^* \bullet x \leftrightarrow r \bullet x \approx r^* x \leftrightarrow r x$ já que o acoplamento fornece mudanças energéticas distintas porém similares devido ao fato dessas estruturas diferirem apenas em suas conformações terciárias; entretanto, isso não ocorre. Dessa forma, a partir da equação 8 fornecida por Henry et al. (1997), i.e. $L_{ij} = Lc^i l^j$, onde $L \in c$ são os parâmetros alostéricos de MWC, i é o número de ligantes acoplados, j é o número de subunidades livres de ligante e l é a constante terciária alostérica de transição, de tal forma que $l=r^*/r$, conclui-se que não há razão para se proceder um ajuste por mínimos quadrados supondo que transições do tipo $r^* \rightarrow r$ possam ocorrer apenas para as j e não para as j+i subunidades, em condições fisiológicas ou não sem incorrer no risco de cometer erros. Essas simplificações ainda que diminuam o número de parâmetros a serem calculados, também conduzem a um desvio significativo do possível comportamento real desse sistema, mesmo se considerarmos a validade do mecanismo e da teoria proposta.

Adotou-se também nesse modelo o uso de uma função linear para descrever as energias livres quaternárias de relaxação. Porém, como considerou-se que esse novo grupo de espécies em solução têm propriedades distintas para a mesma estrutura com um determinado número de ligantes acoplados, poder-se-ia esperar que essas energias livre de relaxação quaternária não descrevessem um comportamento linear devido ao grande número de espécies em solução e à sua dependência distinta em relação aos fatores externos. Essa consideração é, por sua vez, válida apenas quando dois estados de afinidade estão envolvidos e não poderia ser levada em conta durante o ajuste dos dados relacionados a modificações quaternárias no modelo proposto, pois essas novas espécies em solução necessitarão de uma condição muito especial para tornar esta simplificação verdadeira. Caso isto não ocorra, os resultados irão possuir pouquíssima correlação com os eventos moleculares observados experimentalmente.

Um outro ponto a ser notado aqui é que a consideração feita por Hopfield (1971) de que as espécies presentes em pH alcalino poderiam ser associadas com a forma R foi baseada nas taxas de reassociação do ligante após fotodissociação com base em parâmetros médios de afinidade e não pode, portanto, ser tomada como uma consequência importante dos resultados obtidos por Gibson ou mesmo de um mecanismo de dois estados conforme assumido por Eaton et al. (1999) e Henry et al. (1997), e supostamente demonstrado por Hagen et al. (1995, 1996). Dessa forma, não há razão para acreditar que tal espécie em altos valores de pH é a forma R dessa Hb. A simples observação de transições médias terciárias ou quaternárias não fornece informação suficiente sobre a direção destas transições, suas intensidades, ou mesmo a taxa de consumo de oxigênio no decorrer da escala de tempo estudada, não corrobora esse modelo ou o seu mecanismo. O uso de descrições empíricas e desnecessárias, tais como a equação 11 apresentada

por Henry et al. (1997), a qual possui parâmetros não correlacionados com as espécies envolvidas no equilíbrio proposto também significa que esse modelo pode conduzir a resultados imprecisos.

A partir dessas restrições e de outras não citadas aqui, o número total de parâmetros a serem obtidos por ajuste dos resultados experimentais reduz-se a sete, além das taxas para transição quaternária. Propõe-se ainda em Henry et al (1997) um total de 600 conexões entre as 85 espécies cinéticas consideradas, ignorando as rx. A análise das informações fornecidas como suporte por esses autores mostra que foi considerada, para as 85 espécies propostas, apenas um tipo de combinação para cada subunidade terciária e um estado de interação dessas com o ligante. Assim, levando-se em conta que se assume, para cada estrutura terciária, transições estruturais independente das outras, seria natural esperarmos que para uma espécie com um dado número de subunidades no estado $r \in r^*$ e interagindo com l ligantes, o número total de possíveis formas isoméricas em solução dependerá do número de combinações que resultam em espécies protéicas com essa característica. Segue, que de forma análoga ao acoplamento do ligante, as equações de equilíbrio para esse caso deveriam necessariamente ser corrigidas desses novos fatores estatísticos porque essas 85 espécies não correspondem a todas as possíveis formas em solução. Uma análise da descrição termodinâmica apresentada por esses autores mostra que isso não foi feito, o que gera motivos suficientes para se descartarem os resultados obtidos, já que os mesmos não representam as propriedades intrínsecas reais do sistema proposto.

Antes de proceder à análise dos resultados fornecidos por este modelo, gostaríamos de enfatizar que o único teste feito para verificar a aplicabilidade desse modelo envolveu apenas a comparação dos resultados teóricos e experimentais obtidos através de uma curva como a mostrada na Fig. 8 A (inclusão) para pH=8,8. Comparando essa figura e a Fig. 8 C com as Figs. 3 B e 4, e considerando o modelo Stc e os resultados experimentais para esse mesmo valor de pH,

conclui-se que o teste feito não foi adequado pelo fato dessas curvas, virtualmente idênticas, poderem ser descritas por um grande número espécies para cada grau de saturação ou intervalo de tempo de tal forma que os resultados obtidos com as mesmas não são necessariamente correlacionados do ponto de vista físico dependendo do mecanismo adotado. O efeito da diluição, por exemplo, nunca foi considerado. Isto também é um fato para todos os outros modelos propostos até o momento.

A partir dos resultados fornecidos por Henry et al. (1997, Tabela 2) para pH=7,4, não é possível reproduzir os dados pois o valor para $k_{diss}(r^*)$ não é fornecido e não pode ser determinado devido as restrições dadas pelo ciclo termodinâmico. Entretanto, se assumirmos que o resultado fornecido para o acoplamento do ligante à estrutura quaternária R, K_R = 3,2x10⁵, relaciona-se ao estado terciário r* obtém-se um valor de $\Delta G'(r*x \leftrightarrow r*+x) = +7,38$ kcal/mol para a temperatura de 293 K. Usando o parâmetro $k_{diss}(r) = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, outros valores para $\Delta G'$ podem ser obtidos, incluindo $\Delta G'(r^*x \leftrightarrow r^* \bullet x) = +9,62$ kcal/mol, $\Delta G'(rx \leftrightarrow r \bullet x) = +13,96$ kcal/mol, $\Delta G'(r^* \bullet x \leftrightarrow r^* + x \equiv r \bullet x \leftrightarrow r + x) = -2,24 \text{ kcal/mol}, \quad \Delta G'(r^* \leftrightarrow r \equiv r^* \bullet x \leftrightarrow r \bullet x) = -1,45 \text{ kcal/mol} \text{ e}$ $\Delta G'(T \leftrightarrow R) = -9.8$ kcal/mol. A partir desses dados podemos ainda calcular $\Delta G'(rx \leftrightarrow r^*x) = +5.3$ kcal/mol. Este resultado não confirma a simplificação feita de que a transição $rx \rightarrow r^*x$ é instantânea e irreversível e de que o ligante não afeta a estrutura protéica. A análise desses resultados mostra inconsistências se primeiro considerarmos que os mesmos são, conforme sugerido, relacionados à transição de cada subunidade. A energia livre de Gibbs para desoxigenação da espécie R nessas condições é +9,05 kcal/mol (Imai and Yonetani, 1975), enquanto o valor obtido pela descrição cinética é +7,38 kcal/mol para a subunidade r* e +11,72 kcal/mol para a subunidade r. Isso representa uma diferença substancial para ser associada apenas a transições terciárias. Assumindo-se o parâmetro fornecido de K_R como sendo relacionado ao

estado terciário *r*, o resultado obtido a partir das taxas fornece valores distintos para o mesmo parâmetro. A construção de um diagrama de energia para esses dados também mostra que a espécie $r^* \cdot x$ é a mais instável e não poderia ser a primeira a ser formada no início do processo de foto-dissociação. Uma vez que a transição $rx \rightarrow r^*x$ foi considerada irreversível espera-se, também, uma afinidade anômala do ligante para a subunidade r^* e uma formação preferencial das espécies rx para o início do processo de foto-dissociação, apesar de essa espécie não ser considerada. Outro resultado fornecido por este modelo foi uma constante alostérica para a transição T-R, L= $2x10^7$, a qual foi dez vezes maior que os valores normalmente encontrados e que pode conduzir a vários desvios do comportamento experimental, apesar das similaridades obtidas e mostradas na Fig. 6 de Henry et al. (1997). Um desses desvios é que a relação *linear* entre o número de prótons liberados e o número de moléculas de oxigênio acopladas, inicialmente descrito por Wyman (1948) e considerado por Szabo e Karplus (1972) (ver por exemplo a Fig. 6 dessa última publicação), não é mais observada a pH=7,4 e tenderá a zero conforme o pH for reduzido, devido a prevalência das espécies tensas durante a maior parte do processo de acoplamento.

Uma das propostas iniciais das medidas cinéticas do processo de acoplamento do ligante à Hb era a de criar condições para se estudar o comportamento das espécies protéicas intermediárias, de forma que os problemas associados às restrições impostas pelos métodos cristalográficos na formação dessas estruturas intermediárias não fossem observados, possibilitando assim uma análise detalhada do mecanismo de reação envolvido nesses processos. Dessa forma, a partir do número aparente, do valor e do comportamento observado para as taxas de reação, esperou-se que seria possível que um ou mais mecanismos de cooperatividade pudessem ser substanciados em detrimento a outros, uma vez que cada um dos modelos possíveis
para explicar esse fenômeno vigentes na época correspondeu a taxas distintas para o acoplamento do ligante e para as transições conformacionais.

Uma propriedade importante do modelo cinético proposto por Henry et al. (1997) relaciona-se ao fato de que este modelo tornou impossível demonstrar a discordância entre a teoria das transições conjuntas e os resultados experimentais com base apenas em uma observação direta dos dados cinéticos. Isso ocorre devido ao grande número de espécies e estados de afinidade assumidos e que podem ser tornados relevantes em solução por meio de um simples aumento ou redução de suas taxas de formação ou consumo, um procedimento que poderia ser aplicado a qualquer outro modelo, porém com muito maior possibilidade de expansão para outros sistemas biológicos se esse modelo não fosse sujeito ao dogma de que o ligante não tem efeito na estrutura protéica.

A Fig. 3 na publicação de Gibson (1959) mostra que de 0 a 5 ms cerca de 90% da dissociação do ligante e mudança conformacional foram revertidas em pH=10,6, enquanto a pH=6,7 esse valor se reduz a 20%. Dessa forma, conclui-se que a velocidade de reversão após o processo de foto-dissociação aumenta com a elevação do pH na condição de escuro (dark condition). As razões para esse aumento na velocidade de associação está relacionada com o ambiente da proteína, de maneira que a ação de massas de prótons está contribuindo distintamente para as taxas de reação das espécies originalmente consideradas em solução. Uma razão adicional poderia ser a formação de uma espécie de maior afinidade pelo ligante, conforme sugerido por Gibson (1959); no entanto, considerou-se nesse trabalho a inclusão dessa espécie e das outras propostas por Henry et al. (1997) e por Eaton et al. (1999), desnecessárias para uma faixa razoável de pH a qual inclui a região fisiológica. Em outras palavras, assumindo-se que a dissociação do ligante envolve mudanças estruturais e eletrostáticas concomitante com a captação

de prótons, poderíamos esperar que uma redução na concentração de íons H^+ em solução tornaria esse processo menos espontâneo devido ao caráter bimolecular de cada taxa de dissociação do ligante com uma consequente redução aparente na velocidade desse processo para altos valores de pH. A Fig. 10, setas verdes, mostra a proposta do modelo Stc para esses processos cinéticos, incluindo um possível efeito de uréia discutido a seguir.

Segue desse mecanismo que cada espécie pode se dissociar do ligante e retornar ao estado associado através das mesmas formas intermediárias e que, dependendo das propriedades padrão de formação e da forma com que essas espécies e seus efetores tomam parte nas relações de equilíbrio, as relações energéticas aparentes entre as mesmas podem ser modulada pelos fatores descritos anteriormente na análise do modelo Stc para o estado estacionário. A Fig. 2 A ilustra tal modulação, de forma que a energia livre de Gibbs aparente para a associação do ligante reduz com o aumento do pH, e uma completa oxigenação torna-se mais espontânea para altos valores de pH sem a necessidade de inclusão de outras espécies. Assim, se assumirmos que uma completa dissociação segue a rota mostrada na Fig. 10 (setas verdes), uma redução nos valores absolutos de $\Delta G'_j$ com a redução do pH facilitará a dissociação do ligante por meio de um aumento na velocidade aparente de dissociação.

Os resultados obtidos por Gibson (1951) em relação ao efeito de p-cloromercuribenzoato (PCMB), uréia, força iônica e extensão do grau de foto-dissociação assim como resultados mais contemporâneos nessa área podem ser, também, explicados por meio do presente esquema. A inclusão de efetores tais como uréia no modelo proposto por Henry et al. (1997) pode ser feita conforme mostrado na Fig. 10 (setas pretas) para uma situação na qual a possível participação desse efetor durante as transições terciárias é desprezada e conduzirá a desvios quantitativos e qualitativos dos resultados experimentais obtidos devido à forma com que esses efetores tomam

parte no equilíbrio. Para o modelo Stc, tais efetores podem ser considerados nesse sistema conforme mostrado pelas setas verdes na Fig. 10. A cinética desse processo irá envolver agora uma ordem maior de reação como uma consequência da participação desse novo efetor no equilíbrio. Pelas mesmas razões apresentadas quando discutimos acerca do efeito Bohr *residual*, o aumento na força iônica desse sistema fornecerá agora um aumento relativo na taxa de associação e/ou dissociação do ligante, dependendo das condições externas, dos efetores envolvidos, da estequiometria da reação e da função de partição de cada taxa. Resultados recentes obtidos por Gibson (1999) que também mostram desvios do modelo de dois estados e de outras propostas similares dos resultados experimentais, podem ser descritos com muita fidelidade pelo modelo Stc.

Finalmente, o fato da proposta de Henry e colaboradores contemplar outros estados de afinidade não significa que esse modelo está livre dos problemas mostrados para a proposta original do modelo de dois estados, uma vez que se espera naturalmente que o mesmo deveria também ser válido para o estado estacionário. Portanto, todos os resultados aqui obtidos são relevantes para a sua avaliação, uma vez que a proposta básica do modelo de dois estados é assumida. Dessa forma, se considerarmos os resultados previstos pelo modelo de dois estados a pH=10,6 na ausência de ligante, e usando o ajuste feito para a Fig. 8 A, obtém-se que esse modelo prevê um equilíbrio entre 50% de espécies na forma tensa desoxigenada e \approx 49% de espécies na forma relaxada desoxigenada para essa condição, um resultado adicional que pode ser facilmente utilizado para corroborar ou descartar a proposta de transições conjuntas.

8. O CONCEITO DE COOPERATIVIDADE SEGUNDO O MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

O conceito atual de cooperatividade em acoplamentos tem sido baseado, até o momento, no equilíbrio entre tautômeros interconvertíveis com distintas energias livres de Gibbs de associação do ligante, porém, idênticas para todos os passos do acoplamento. Estas considerações implicam em ausência de mudanças estruturais associadas ao acoplamento do ligante, e pressupõe que transições estruturais são produzidas no decorrer da saturação protéica devido a diferenças nos níveis energéticos que separam esses tautômeros com o mesmo número de ligantes acoplados, sendo que esses níveis energéticos determinam as espécies prevalentes para cada estado de saturação protéica. O modelo de dois estados (Monod et al., 1965) considera que as duas únicas conformações presentes em quantidades significativas correspondem a uma de baixa e outra de alta afinidade pelo ligante (*T* e *R*, respectivamente). O modelo sequencial (Koshland et al., 1966) também aceita apenas dois estados de afinidade para a subunidade, embora nesse modelo a mesma molécula possa apresentar subunidades com mais de uma conformação.

O modelo Stc difere dos modelos anteriores por considerar fundamental o papel do ligante, da dissociação e de efetores tais como prótons no comportamento protéico dinâmico, estrutural e energético durante o processo cooperativo. A proposta básica desse modelo é que o acoplamento do ligante pode, em princípio, produzir um efeito local se ele não muda a afinidade dos outros sítios livres mas, em um processo cooperativo, o acoplamento do ligante pode induzir mudanças conformacionais que transcendem as interações subunidade-subunidade. A formação de espécies com o mesmo número de ligantes acoplados, mas com estruturas terciárias ou quaternárias distintas, não é necessariamente obtida por meio de transições conjuntas. Postula-se também que, durante as mudanças conformacionais observadas para este processo, as estruturas

protéicas formadas em solução são estabilizadas por meio de prótons em quantidades estequiometricamente definidas para uma dada faixa de pH, e que efetores podem da mesma forma tomar parte nesses equilíbrios nos passos plausíveis de reação. A extensão e a intensidade dessas mudanças conformacionais irão depender da susceptibilidade da proteína a tais modificações, do número de ligantes acoplados, do grau de dissociação, da formação de tautômeros e das condições do meio onde estas proteínas realizam tais processos cooperativos.

Dessa forma, um acoplamento cooperativo pode ser subdividido em duas classes: estrutural e aparente. A primeira envolve modificações intrínsecas na estrutura protéica de forma a facilitar o próximo passo de acoplamento. Esse fenômeno aumenta a probabilidade de colisões efetivas, reduzindo a barreira estérica a ser transposta por cada acoplamento por meio de modificações no caráter eletrostático dos sítios livres ou da formação de isômeros estruturais de maior afinidade. O acoplamento cooperativo aparente reflete a influência de fatores estatísticos, temperatura, força iônica, concentração protéica e ação de massas de prótons ou outros efetores. A intensidade desses efeitos na cooperatividade aparente é determinada pelo número de sítios protéicos, pelas condições externas e pelo efeito do íon comum, o qual fornece mudanças energéticas distintas para o processo em questão, dependendo dos valores de v_j e $v_{D,j}$ e da carga da proteína. Dessa forma, um acoplamento com cooperatividade estrutural pode apresentar um comportamento macroscópico cooperativo ou mesmo antagônico em relação ao caráter aparente desse acoplamento dependendo do meio em que esse processo ocorre. Em outras palavras, se cada acoplamento do ligante aumenta progressivamente a exposição dos sítios livres por meio de modificações estruturais que envolvem durante esse processo a captura ou liberação de prótons ao meio externo à proteína, uréia ou outro efetor, aumentando dessa maneira a probabilidade de acoplamentos efetivos, segue que, para uma situação na qual os primeiros passos do acoplamento

liberam uma quantidade pequena de prótons, enquanto os últimos liberam um número relativamente maior, o aumento no pH favorecerá preferencialmente os últimos passos promovendo um acoplamento cooperativo *aparente*, ao passo que para valores reduzidos de pH esses últimos passos serão mais difíceis devido ao grande número de prótons livres em solução. Essa última situação pode gerar um acoplamento antagônico aparente, dependendo das propriedades padrão de formação de cada uma dessas espécies e da estequiometria das reações, apesar de o acoplamento ser cooperativo do ponto de vista estrutural para ambas as situações. A formação de tautômeros com afinidades diferenciadas pelo ligante, assim como o de espécies desnaturadas tais como as observadas durante o enovelamento proteico, segue a mesma idéia de forma que este último processo pode ser melhor detalhado subdividindo-se de maneira conveniente os fenômenos expressos na Fig. 1. Assim, a velocidade de um enovelamento cooperativo pode ser modulada pelos fatores externos e o processo pode também vir a ser antagônico para uma série de passos tais como o descrito para o acoplamento. Se não há formação de espécies tautoméricas em quantidades significativas, o número de estruturas possíveis esperadas é 2^n , que corresponde a todas as possíveis combinações do(s) ligante(s) aos sítios protéicos quando cada um desses isômeros define uma estrutura quaternária distinta. Quando cada uma dessas combinações gera uma afinidade distinta entre cada isômero mas igual para as subunidades livres presentes na mesma molécula, o número total de estados de afinidade gerados é 2^{n} -1 e pode se tornar maior se essa igualdade de afinidade das subunidades livres de uma mesma molécula não puder ser assumida. Em contraste, se os estados estruturais e de afinidade dessas espécies isômeras quanto ao número de ligantes não difere significativamente, o número de estados de afinidade necessários para uma caracterização termodinâmica pode ser reduzido e corrigido de seus fatores estatísticos.

A Fig. 11 mostra um esquema simplificado do modelo Stc para Hbs em termos de suas espécies tetraméricas predominantes, e que sumariza a participação obrigatória de ligantes e efetores, podendo assim ser modulado por ação de massas. Com base nesse



FIGURA 11. Esquema simplificado de oxigenação da Hb de acordo com o modelo Stc, considerando somente as espécies tetraméricas, e sem considerar a formação de espécies tautoméricas com diferentes estados de protonação. As mudanças conformacionais na proteína dependem do acoplamento do ligante e causam a liberação de prótons, representada pelas diferentes cores a cada acoplamento com o ligante. As modificações nos sítios e nas subunidades

após cada acoplamento com o oxigênio e a conseqüente perda de restrições são representadas pela progressiva mudança de quadrados a círculos.

conceito, se um tautômero de alta afinidade pelo ligante é formado, por exemplo uma espécie de Hb obtida por meio de um fenômeno F_c (Fig. 1 A), a existência de tal espécie em concentrações significativas será possível apenas por meio de ação de massas de prótons o que por sua vez depende do pH. Considerando-se que na Hb humana a maioria dos prótons liberados durante o acoplamento está na interface das subunidades (Pettigrew, 1982; Weber, 1982; Mihailescu, 2001), pode-se concluir que um aumento no pH pode, também, gerar uma desprotonação de resíduos não relacionados ao efeito Bohr presentes em regiões mais suscetíveis a tal processo (*e.g.*, formação de tautômeros devido aos fenômenos F_0 ou F_d). Embora este efeito não modifique diretamente a afinidade intrínseca dos sítios ativos, esses prótons podem afetar as relações entre as energias livres de Gibbs aparentes das diferentes possíveis espécies tautoméricas em um hipotético estado $T \in R$ (Fig. 1 B). Essa participação adicional de outros resíduos na formação dessas espécies fará com que as relações energéticas entre as mesmas fiquem mais sensíveis ao pH devido ao aumento no número de prótons necessário à sua formação, porém muito mais realista do que a forma proposta na literatura para esse mecanismo de transição.

9. CONCLUSÃO E SUGESTÕES

A aplicação de qualquer uma das metodologias desenvolvidas nesta dissertação mostrou que o modelo de dois estados não foi capaz de fornecer a uma correta descrição do comportamento experimental observado para Hbs, e que o mecanismo baseado em transições conjuntas não é capaz de explicar o fenômeno cooperativo adequadamente nessa proteína segundo os parâmetros utilizados. A ausência de uma metodologia explícita que considere o papel fundamental de efetores (como prótons) nesses sistemas restringe o uso do modelo de dois estados como uma ferramenta de análise. Quando uma dependência do pH é introduzida, o comportamento protéico previsto pelos modelos baseados em transições conjuntas em diferentes condições mostra desvios em relação aos dados experimentais utilizados que, ao mesmo tempo, revelam a séria limitação dos mesmos e a necessidade de se reconsiderar tais conceitos. A inclusão de um terceiro estado híbrido conforme sugerido por vários autores, de fato pode fornecer uma melhor descrição das interações entre as subunidades, mas não é suficiente para explicar satisfatoriamente o processo cooperativo.

A notável alta estabilidade das estruturas protéicas médias formadas por dissociação ou acoplamento do ligante, observada por meio de um constante estado de protonação em uma ampla faixa de pH, sugere que tais espécies têm, também, um papel funcional de tamponar esses sistemas. Essa ação ocorre concomitante com um aumento significativo no transporte, velocidade e eficiência da função da proteína.

Versões mais recentes do modelo de dois estados, tais como as modificações cinéticas propostas por Henry et al. (1997) são, por razões similares, inconsistentes com os resultados energéticos obtidos a partir das medidas em estado estacionário, não possuem uma base estrutural convincente e necessitam de uma demonstração mais conclusiva de sua aplicabilidade. A observação de estruturas protéicas por cristalografia não deve excluir a existência de formas intermediárias se a estrutura destas formas é observada de modo que transições conformacionais não tenham sido permitidas durante a formação das mesmas. Caso contrário, estará se fazendo um uso inadequado dos resultados fornecidos por esse tipo de experimento para excluir um

dentre os vários modelos de cooperatividade presentes na literatura. Em adição a esse ponto, o fato de pequenas mudanças estruturais, em um dado passo do acoplamento, não resultarem em modificações macroscópicas significativas na estrutura quaternária não é uma evidência suficiente para excluir o efeito dessas modificações no processo cooperativo associadas ao ligante para uma dada condição do meio externo.

Finalmente, para estes modelos, uma demonstração convincente da existência de transições conjuntas para Hbs durante o exercício normal das funções deve ser dada de maneira apropriada do ponto de vista energético, estrutural e dinâmico; caso contrário, questões fundamentais acerca da eficiência e da velocidade com que uma proteína exerce a sua função ou de como ela é produzida e enovelada perfeitamente no interior da célula permanecerão obscuras e repletas de interpretações ambíguas.

O modelo Stc, em contraste, fornece uma concordância de seus dados com os resultados experimentais, prediz o comportamento de Hbs em várias condições e permite a obtenção de parâmetros importantes que podem conduzir a avanços das técnicas experimentais de análise, separação ou mesmo produção de espécies químicas específicas. A utilização desse modelo para Hb de serpente reforça a sua aplicabilidade, no momento em que ele explica em detalhes esse mecanismo de dissociação e cooperatividade. Embora o modelo Stc tenha se mostrado uma ferramenta poderosa de análise, ele é bastante simples, uma vez que se baseia nos princípios da físico-química clássica para descrever sistemas macroscópicos.

A alta qualidade dos resultados obtidos pelo modelo Stc indica um potencial considerável de aplicação do mesmo a outros sistemas biológicos (cooperativos ou não) incluindo enzimas, complexos multienzimáticos, vírus, proteínas de membrana e processos de enovelamento protéico dentre outros. Tal aplicabilidade pode ser ainda estendida pelo fato de que este modelo não é baseado no conceito de que o ligante não tem efeito na estrutura protéica, não limitando desta forma seu uso apenas para Hbs.

No caso das Hbs, as relações aparentes de equilíbrio assumidas na ausência de dissociação são idênticas às obtidas pelo clássico esquema de Adair. Assim, os diferentes métodos de ajuste por mínimos quadrados desenvolvidos para este esquema podem ser prontamente aplicados com base no modelo Stc, com a vantagem de que outros parâmetros poderão ser estimados. Para as regiões limites de pH ácido e básico o aparecimento de tautômeros com afinidades pelo ligante distintas das espécies inicialmente consideradas pode ser tomada de modo independente para cada estado de saturação da proteína. Assim, a formação de estruturas relaxadas pode ocorrer de forma que o ligante ainda tenha efeito no processo cooperativo e, mesmo quando isso não ocorrer, as estruturas relaxadas formadas podem ter estados de protonação distintos para cada grau de saturação.

Embora os parâmetros de análise utilizados aqui, incluindo o índice de efeito e a assimetria, necessitem de um estudo mais detalhado do seu comportamento para grandes agregados protéicos, a sua utilidade para investigação das interações protéicas é óbvia e merece ser considerada. Um ponto adicional a ser enfatizado é que o modelo Stc pode ser simplificado para descrever o modelo proposto por Henry e colaboradores ou qualquer outro existente até o momento com a vantagem de que a descrição termodinâmica fornecida por este modelo estará incluindo o efeito de qualquer efetor, força iônica, pH e dissociação, assim como outros parâmetros correlacionados usando-se uma metodologia muito mais relacionada com as espécies consideradas em solução do que as propostas de Szabo e Karplus (1972) ou qualquer outra atual.

Conforme mostrado no decorrer desta dissertação, a proposta original de Georges e Pauling (1951) de que o ligante tem um papel fundamental no processo cooperativo de Hbs é sustentada pelo modelo Stc e é a explicação mais plausível para os resultados obtidos nesse trabalho.

10. REFERÊNCIAS

Abbasi, A., and G. Braunitzer. 1991. Primary structure of hemoglobin from monitor lizard (*Varanus exanthematicus albigularis* - Squamata). *Biol. Chem. H-S.* 372:473-479.

Abbasi, A., R. M. G. Wells, and T. Brittain. 1988. Primary structure of the hemoglobins from sphenodon (*Sphenodon punctatus*, tuatara, hynchocephalia). Evidence for the expression of alpha-d-gene. *Biol. Chem. H-S.* 369:755-764.

Ackers, G. K., and M. L. Johnson. 1981. Linked functions in allosteric proteins. Extension of the concerted (MWC) model for ligand-linked subunit assembly and its application to human hemoglobins. *J. Mol. Biol.* 147:559-582.

Ackers, G. K., J. M. Holt, Y. Huang, Y. Grinkova, A. L. Klinger, and I. Denisov. 2000.
Confirmation of a unique intra-dimer cooperativity in the human hemoglobin a1b1 half-oxygenated intermediate supports the symmetry rule model of allosteric regulation. *Proteins* S4:23-43.

Antonini, E., and M. Brunori. 1971. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland publishing company- research monographs V. 21. Antonini, E., J. Wyman, M. Brunori, E. Bucci, C. Fronticelli, and A. Rossifanelli. 1963. Studies on relations between molecular and functional properties of hemoglobin .IV. Bohr effect in human hemoglobin measured by proton binding. *J. Biol. Chem.* 238:2950-2957.

Aschauer, H., R. E. Weber, and G. Braunitzer. 1985. The primary structure of the hemoglobin of the dogfish shark (*Squalus acanthias*). Antagonistic effects of ATP and urea on oxygen affinity of an elasmobranch hemoglobin. *Biol. Chem. H-S.* 366:589-599.

Berry, R. S., S. A. Rice, and J. Ross. 2000. Physical Chemistry, Second Edition. Oxford University Press. New York, Oxford.

Bonafe, C. F. S.; J. R. Araujo, and J. L. Silva. (1994) Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry*. 33:2651-2660.

Bonafe, C. F. S., A. Y. Matsukuma, and M. S. A Matsuura. 1999. ATP-induced tetramerization and cooperativity in lower vertebrate hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 274:1196-1198.

Brittain, T. 1988. An investigation of the functioning of the two major hemoglobins of the sphenodon using fast reaction kinetic methods. *Biochem. J.* 251:771-776.

Brittain, T. 1991. Cooperativity and allosteric regulation in nonmammalian vertebrate hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 99:731-740.

Brzozowski, A., Z. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, M. Grabowski, R. Liddington, T. Skarzynski, and D. Vallely. 1984. Bonding of molecular-oxygen to T-state human-hemoglobin. *Nature*. 307:74-76.

Bull, C., G. Goncher, C. S. Deutschma, and B. M. Hoffman. 1977. Source of residual Bohr effect in hemoglobin oxidation. *J. Biol. Chem.* 252:3128-3130.

Chu, A. H., B. W. Turner, and G. K. Ackers. 1984. Effects of protons on the oxygenation-linked subunit assembly in human hemoglobin. *Biochemistry*. 23:604-617.

Eaton, W. A., E. R. Henry, J. Hofrichter, and A. Mozzarelli. 1999. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? *Nat. Struct. Biol.* 6:351-358.

Edelstein, S. J. 1996. An allosteric theory for hemoglobin incorporating asymmetric states to test the putative molecular code for cooperativity. *J. Mol. Biol.* 257:737-744.

Edelstein, S. J., and J. T. Edsall. 1986. Linkage between ligand binding and the dimer-tetramer equilibrium in the Monod-Wyman-Changeux model of hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 83:3796-3800.

Edsall, J.T., and J. Wyman. 1958. Biophysical Chemistry. V.1. Academic Press Inc. Publishers. New York.

Eigen, M. 1968. New looks and outlooks on physical enzymology. Quart. Rev. Biophys. 1:3-33.

Erijman, L., and G. Weber. 1991. Oligomeric protein associations: transition from stochastic to deterministic equilibrium. *Biochemistry* 30:1595-1599.

George, R. C. C., and L. Pauling. 1951. The combining power of hemoglobin for alkyl isocyanides, and the nature of the heme-heme interactions in hemoglobin. *Science* 114:629-634.

Gibson Q. H. 1959. Photochemical formation of a quickly reacting form of haemoglobin. *Biochem. J.* 71: 293-303.

Gibson, Q.H. 1999. Kinetics of oxygen binding to hemoglobin A. Biochemistry. 38:5191-5199.

Gorr, T., T. Kleinschmidt, and J. G. Sgouros. 1991. A Living fossil sequence - primary structure of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) hemoglobin evolutionary and functional-aspects. *Biol. Chem. H-S.* 372:599-612.

Hagen S., J., J. Hofrichter, and W. A. Eaton. 1995. Protein reaction-kinetics in a room-temperature glass. *Science*, 269:959-962.

Hagen, S. J., J.Hofrichter, and W. A. Eaton. 1996. Geminate rebinding and conformational dynamics of myoglobin embedded in a glass at room temperature. *J. Phys. Chem.* 100:12008-12021.

Henry, E. R., C. M. Jones, J. Hofrichter, and W. A. Eaton. 1997. Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics? *Biochemistry* 36:6511-6528.

Herzfeld, J., and H. E. Stanley, 1974. General approach to cooperativity and its application to oxygen equilibrium of hemoglobin and its effectors. *J. Mol. Biol.* 82:231-265.

Hofrichter, J., J. H. Sommer, E. R. Henry, and W. A. Eaton. 1983. Nanosecond absorption spectroscopy of hemoglobin. Elementary processes in kinetic cooperativity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 80:2235-2239.

Hopfield, J. J., R. G. Shulman, and S. Ogawa. 1971. Allosteric model of hemoglobin .1. Kinetics. *J. Mol. Biol.* 61:425-443. Imai, K., and T. Yonetani. 1975. pH-dependence of Adair constants of human hemoglobin nonuniform contribution of successive oxygen bindings to alkaline Bohr effect. *J. Biol. Chem.* 250:2227-2231.

Koshland, Jr., D. E., G. Némethy, and D. Filmer. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*. 5:365-385.

Liddington, R., Z. Derewenda, G. Dodson, and D. Harris. 1988. Structure of the liganded T-state of hemoglobin identifies the origin of cooperative oxygen binding. *Nature* 331:725-728.

Matsuura, M. S. A., K. Fushitani, and A. F. Riggs. 1989. The amino acid sequences of the alphachains and beta-chains of hemoglobin from the snake *Liophis miliaris*. *J. Biol. Chem.* 264:5515-5521.

Matsuura, M. S. A., S. H. Ogo, and A. Focesi Jr. 1987. Dimer-tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*. Effect of organic polyphosphates. *Comp. Biochem. Physiol.* 86:683-687.

Mihailescu, M. R. and I. M. Russu. 2001. A signature of the T-R transition in human hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 98:3773-3777.

Mills F. C., M. L. Johnson, and G. K. Ackers. 1976. Oxygenation-linked subunit interaction in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. *Biochemistry*. 15:5350-5362.

Minton, A. P. and K. Imai. 1974. The three-state model: a minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 71:1418-1421.

Monod, J., J. Wyman, and J. P. Changeux. 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118.

Mozzarelli, A., C. Rivetti, G.L. Rossi, E.R. Henry, and W.A. Eaton. 1991. Crystals of hemoglobin with the T-quarternary structure bind oxygen noncooperatively with no Bohr effect. Nature 351:416-419.

Murray, L. P., J. Hofrichter, E. R. Henry, M. Ikedasaito, K. Kitagishi, T. Yonetani, and W.A. Eaton. 1988. The effect of quaternary structure on the kinetics of conformational-changes and nanosecond geminate rebinding of carbon monoxide to hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 85:2151-2155.

Palladine, A. A., and G. Weber. 1981. Pressure-induced reversible dissociation of enolase *Biochemistry* 20:2587-2593.

Perrella, M., L. Benazzi, M. A. Shea, and G. K. Ackers. 1990. Subunit hybridization studies of partially ligated cyanomethemoglobins using a cryogenic method. Evidence for three allosteric states. *Biophys. Chem.* 35:97-103.

Perutz, M. F., H. Muirhead, J. M. Cox, and L. C. G. Goaman. 1968. 3-Dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 a resolution - atomic model. *Nature*. 219:131-139.

Petruzzelli, R., G. Aureli, A. Lania, A. Galtieri, A. Desideri, and B. Giardina. 1996. Diving behavior and haemoglobin function: the primary structure of the α - and β -chains of the sea turtle (*Caretta caretta*) hemoglobin and its functional implications. *Biochem. J.* 316:959-965.

Pettigrew, D. W., P. H. Romeo, A. Tsapis, J. Thillet, M. L. Smith, B. W. Turner, and G. K. Ackers. 1982. Probing the energetics of proteins through structural perturbation. Sites of regulatory energy in human hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 79:1849-1853.

Riggs, A. F. 1988. The Bohr effect. Annu. Rev. Physiol. 50:181-204.

Rivetti, C., A. Mozzarelli, G.L. Rossi, E. R. Henry, and W.A. Eaton. 1993. Oxygen binding by single-crystals of hemoglobin. *Biochemistry* 32:2888-2906.

Ruan, K., and G. Weber. 1993. Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation. *Biochemistry* 32:6295-6301.

Rucknagel, K. P., and G. Braunitzer. Hemoglobins of reptiles. 1988. The primary structure of the major and minor hemoglobin component of adult western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*). *Biol. Chem. H-S* 369:123-131.

Rucknagel, K. P., G. Braunitzer, and H. Wiesner. 1988. Hemoglobins of reptiles. The primary structures of the α^{I} -chains and β^{I} -chains of common iguana (*Iguana iguana*) hemoglobin. *Biol. Chem. H-S* 369:1143-1150.

Sandler, S. I. 1999. Chemical and Engineering Thermodynamics. John Wiley and Sons. chap. 7 and 9. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

Sawicki, C. A, and Q. H. Gibson. 1976. Quaternary conformational-changes in human hemoglobin studied by laser photolysis of carboxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 251:1533-1542.

Shibayama, N., and S. Saigo. 1995. Fixation of the quaternary structures of human adult hemoglobin by encapsulation in transparent porous silica-gels. *J. Mol. Biol.* 251:203-209.

Silva, J. L., M. S. Villas-Boas, C. F. S. Bonafe, and N. C. Meirelles. (1989) Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 264:15863-15868.

Smith, F. R., and G. K. Ackers. 1985. Experimental resolution of cooperative free energies for the ten ligation states of human-hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 82:5347-5351.

Smith, F. R., D. Gingrich, B. M. Hoffman, and G. K. Ackers. 1987. Three-state combinatorial switching in hemoglobin tetramers: comparison between functional energetics and molecular structures. *Biophysics*. 84:7089-7093.

Sonntag, R. E., and G. J. Van Wylen. 1965. Fundamentals of statistical thermodynamics. John Wiley and Sons. New York.

Szabo, A., and M. Karplus. 1972. Mathematical model for structure-function relations in hemoglobin. *J. Mol. Biol.* 72:163-197.

Tyuma, I., K. Imai, and K. Shimizu. 1973. Analysis of oxygen equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic phosphates. *Biochemistry*. 12:1491-1498.

Tyuma, I., K. Shimizu, and K. Imai. 1971. Effect of 2,3-diphosphoglycerate on cooperativity in oxygen binding of human adult hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:423-428.

Watt, K. W. K., T. Maruyama, and A. Riggs. 1980. Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana* - amino acid sequence of the beta-chain of a major component. *J. Biol. Chem.* 255:3294-3301.

Weber G. 1972. Ligand binding and internal equilibria in proteins. *Biochemistry*. 11:864-878.

Weber, G. 1982. Asymetric ligand binding by haemoglobin. Nature 300:603-607.

Weber, G. 1984. Order of free energy coupling between ligand binding and protein subunit association in hemoglobin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 81:7098-7102.

Weber, G. 1986. Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effects of dilution and of hydrostatic-pressure. *Biochemistry* 25:3626-3631.

Weber, G. 1987. Abrupt transitions in physics and biophysics - van der Waals revisited.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. 84:7359-7362.

Weber, G. 1992. Protein Interactions. Chapman & Hall. 107. Chapman & Hall, New York, NY.

Weber, R. E. and F. B. Jensen. 1988. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 50:161-179.

Wyman, J. 1948. Heme proteins. Adv. Prot. Chem. 4:407-531.

Wyman, J. 1964. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Protein Chem.* 19:223-286.

Wyman J. 1965. Binding potential a neglected linkage concept. J. Mol. Biol. 11:631-636.

Xu, G. J., and G. Weber. 1982. Dynamics and time-averaged chemical-potential of proteins importance in oligomer association. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 79:5268-5271.

APÊNDICE A

INTRODUÇÃO À ANÁLISE DE SISTEMAS TERMODINÂMICOS

Nos trabalhos aqui desenvolvidos foram realizadas análises de processos biológicos do ponto de vista energético. Utilizou-se para isto conceitos desenvolvidos no âmbito da termodinâmica clássica e da teoria existente para equilíbrio rápido, os quais, por sua vez, foram aplicados a sistemas biológicos multireacionais e interdependentes. Tais conceitos são, no entanto, fruto da observação científica e do trabalho minucioso de vários e notáveis cientistas que, questionando-se a respeito da natureza dos processos físico-químicos, construíram essa difícil e poderosa ferramenta de análise. Como consequência, o estudo desses sistemas requer um conhecimento prévio das diversas e muitas vezes complexas idéias envolvidas na caracterização dos fenômenos responsáveis pelo comportamento termodinâmico dos mesmos e que conduzem à natureza em si do estado de equilíbrio.

Objetivando fornecer uma pronta referência a tais conceitos, sem contudo se aprofundar nos diversos tópicos, achou-se conveniente uma breve introdução aos mesmos já que estes não são, via de regra, de conhecimento geral. Uma abordagem mais detalhada dos tópicos que serão aqui discutidos pode ser obtida diretamente das referências a partir das quais este apêndice foi baseado e que estão listadas ao final do mesmo.

Assim, definindo-se um sistema termodinâmico como uma quantidade de matéria, de massa e identidade fixas, ao qual dirigimos nossos estudos. O primeiro passo na análise de tais sistemas consiste em especificar um volume de controle que o envolve. Na figura A1 este volume é delimitado pelas linhas tracejadas.



Figura A1. Representação esquemática de um processo cíclico completamente reversível de compressão-descompressão. Todo calor liberado para a vizinhança do sistema é absorvido na etapa seguinte.

A primeira lei da termodinâmica estabelece o princípio da conservação da energia. A implicação matemática desta lei para um sistema percorrendo um ciclo completamente reversível como o mostrado na Figura A1, é que a integral cíclica da energia calorífica que atravessa a fronteira desse sistema é igual à integral cíclica do trabalho realizado, ou seja:

$$\oint \delta Q = \oint \delta W \tag{1a}$$

Deve-se notar que a energia calorífica (Q) é uma energia de transferência, isto é, ela só é detectada quando atravessa a fronteira de um sistema. Dessa forma, nenhum sistema contém energia calorífica. Um outro ponto a ser observado é que tanto o trabalho (W) quanto o calor (Q) não dependem unicamente dos estados finais e iniciais do sistema mas, também, do caminho percorrido pelo mesmo durante o processo de compressão e descompressão. Portanto, tanto W quanto Q serão obtidos por meio de integrais de linha. Para sistemas percorrendo um ciclo, a Eq.1a pode ser aplicada, entretanto, na maioria dos processos naturais, de interesse científico ou

tecnológico, esses sistemas estão em geral passando por uma mudança de estado. Consideremos então o processo mostrado na Figura A2.



Figura A2. Representação esquemática de um processo cíclico completamente reversível de compressão-descompressão. O processo de compressão pode ocorrer pelo caminho A, enquanto o de descompressão pode ocorrer por A ou B.

Nesse processo, a mudança do estado 1 para o estado 2 ocorre pelo caminho A e o retorno do estado 2 para o estado 1 pode ocorrer por dois caminhos diferentes, B ou C. Assim, indo por A e voltando por B, temos

$$\int_{1A}^{2A} \delta Q + \int_{2B}^{1B} \delta Q = \int_{1A}^{2A} \delta W + \int_{2B}^{1B} \delta W$$
Eq.1.1a

Indo por A e voltando por C

$$\int_{1A}^{2A} \delta Q + \int_{2C}^{1C} \delta Q = \int_{1A}^{2A} \delta W + \int_{2C}^{1C} \delta W$$
Eq.1.2a

Subtraindo a Eq.1.1a da Eq.1.2a:

$$\int_{2B}^{1B} (\delta Q - \delta W) = \int_{2C}^{1C} (\delta Q - \delta W)$$
Eq.1.3a

A análise dessa equação mostra que a quantidade $(\delta Q - \delta W)$ é a mesma para qualquer que seja o caminho percorrido pelo sistema. Trata-se, portanto, de uma propriedade do sistema que depende unicamente do estado final e inicial do mesmo. Essa propriedade é a energia do sistema (*E*), a qual pode ser convenientemente subdividida, considerando-se a energia cinética (*E_c*) e a potencial (*E_p*) separadas das demais energias, e que podem ser todas agrupadas em uma propriedade que chamaremos de energia interna (*U*). Essas energias, por dependerem unicamente dos estados inicial e final do sistema, poderão ser obtidas por meio de integrais de ponto, logo

$$\int dE = \int dU + \int dE_C + \int dE_P$$
 Eq.1.4a

Para uma mudança de estado, obtemos da Eq.1.3a que

$$\delta Q = \delta W + dU + dE_c + dE_p$$
 Eq.1.5a

Caso não haja variação de energia cinética e potencial,

$$\delta Q = dU + \delta W$$
 Eq.1.6a

O termo δW , relativo ao trabalho desenvolvido no sistema, e pode, ainda, ser escrito como uma função do volume da seguinte forma:

$$\delta W = Fdx = \frac{F}{A}Adx = PdV$$

onde *A* é a área transversal do volume de controle, considerado aqui constante. E segue que:

$$\delta Q = dU + PdV$$
 Eq.1.7a

Dessa forma, a variação de energia calorífica que atravessa as fronteiras de um sistema composto por uma substância pura, isto é, uma substância cuja composição química permanece

homogênea e invariável, é igual à variação de energia interna mais o trabalho realizado no sistema ou pelo sistema durante uma mudança de estado. Portanto, à pressão constante:

$$\int_{1}^{2} \delta Q = \int_{1}^{2} dU + P \int_{1}^{2} dV$$

$$Q_{1,2} = (U_{2} - U_{1}) + P(V_{2} - V_{1})$$

$$Q_{1,2} = (U_{2} + PV_{2}) - (U_{1} + PV_{1})$$
Eq.1.8a

onde os índices 1 e 2 representam os estados do sistema.

Verifica-se que a transferência de calor durante essa mudança de estado é dada em termos da quantidade (U + PV). Como todos os elementos dessa expressão são propriedades termodinâmicas, funções apenas dos estados inicial e final do sistema, a combinação dos mesmos deve obrigatoriamente ter as mesmas características. Torna-se, então, conveniente definir uma nova propriedade termodinâmica, a qual denominaremos entalpia (H), tal que

$$H = U + PV$$
Eq.1.9a

E segue-se que

$${}_{1}^{2}Q = H_{2} - H_{1}$$

Chegando a esse ponto necessitaremos introduzir a segunda lei da termodinâmica, de maneira a obtermos relações que expressem a dependência da energia calorífica em termos de outras variáveis mais palpáveis de sistema. Para isso partiremos da análise do comportamento de máquinas térmicas para obtermos uma idéia mais embasada acerca desses processos de transferência de energia em ciclos reversíveis, ou de Carnot, e não reversíveis. O principal significado dessa lei envolve o fato de que processos ocorrem naturalmente em um determinado sentido, mas não no oposto. Ou seja, um corpo 'quente' sempre cede calor para um corpo 'frio' e não o contrário. Dessa forma, considerando o arranjo abaixo composto por dois reservatórios a

temperatura T_h ("high-temperature") e T_l ("low-temperature") constantes e uma máquina térmica (Fig. A3).



Figura A3. Representação esquemática de uma máquina térmica irreversível operando entre dois reservatórios, um a alta (T_h) e outro a baixa (T_l) temperatura.

Tomando a eficiência (η) de uma máquina térmica como a razão entre o trabalho realizado por esta máquina (W) e a energia que entra (Q_h) na mesma, temos:

$$\eta = \frac{W}{Q_h}$$
, onde; $W = Q_h - Q_l$.

Assim:

$$\eta = \frac{Q_h - Q_l}{Q_h} = 1 - \frac{Q_l}{Q_h}$$
Eq.2a

Observando essa equação nota-se que a eficiência de uma máquina térmica depende exclusivamente das quantidades $Q_l \in Q_h$. Para uma melhor compreensão da implicação dessa relação nos processos de conversão de trabalho em energia calorífica e vice versa, procuraremos inicialmente saber qual máquina operando entre dois reservatórios a temperaturas distintas é mais eficiente, a reversível ou a irreversível. Assim, considerando agora uma máquina térmica operando entre dois reservatórios a $T_h e T_l$, tal que todo o processo seja reversível, essa máquina se torna um refrigerador (Fig. A4).



Figura A4. Representação esquemática de uma máquina térmica reversível operando entre dois reservatórios, um a alta (T_h) e outro a baixa (T_l) temperatura.

Por outro lado, podemos assumir, também, a existência de uma máquina irreversível operando entre os mesmos reservatórios, a T_H e T_L e que esta possui uma eficiência hipoteticamente maior que a da máquina reversível. A Fig.A5 esquematiza esse arranjo.



Figura A5. Representação esquemática de uma associação de máquinas térmicas operando entre dois reservatórios, um a alta (T_h) e outro a baixa (T_l) temperatura, de modo que a eficiência da máquina irreversível é suposta maior que a da máquina reversível.

onde:

$$W_I = W_{NET} + W_{REV} = Q_h - Q_l$$

$$W_{REV} = Q_h - Q_l$$

e ;

 $W_{NET} = Q_l - Q_l'$

Como a eficiência da máquina irreversível é assumida por hipótese ser maior que a da máquina reversível, podemos dizer que:

$$W_{NET} > 0 :: Q_l - Q_l' > 0$$

logo $Q_l > Q_l'$

Entretanto, observando-se o arranjo da Fig.A5 e esta última expressão, constatamos que uma certa quantidade de trabalho, W_{NET} , é produzida pela troca de calor com um único reservatório, o que viola a segunda lei da termodinâmica no que diz respeito ao postulado de Kelvin-Planck, que diz:

'É impossível construir uma máquina que opere em um ciclo e não produza outro efeito além do levantamento de um peso e da troca de calor com um único reservatório.'

Isto é, pode-se realizar trabalho pela transferência de calor apenas se existirem dois níveis de temperatura envolvidos. Dessa forma, conclui-se que não se pode ter uma máquina irreversível mais eficiente que uma máquina reversível. Portanto, o ciclo onde todo o trabalho gerado pela máquina irreversível é utilizado pela máquina reversível é o mais eficiente, e a este dá-se o nome de "ciclo de Carnot". Assim, para tais ciclos, a eficiência é a mesma para ambas as máquinas e $W_I = W_{REV}$. Uma vez que a eficiência dessas máquinas é função das temperaturas $T_h e T_l$ para qualquer que seja a substância, a partir da Eq.2a podemos obter a dependência desses processos em relação à temperatura em termos de uma escala absoluta como segue:

$$\eta = 1 - \frac{Q_l}{Q_h}$$
 ou,
 $\frac{Q_l}{Q_h} = \Psi(T_h, T_l)$ Eq.2.1a

onde Ψ é uma função de T_h e T_l .

Suponha agora o seguinte arranjo



Figura A5. Representação esquemática de uma associação em série de máquinas térmicas irreversíveis operando entre três e dois reservatórios.

Tal que, Q_1 é o mesmo para A e C e desde que nós estejamos lidando com ciclos, da Eq.2.1a obtemos:

 $\frac{Q_2}{Q_1} = \Psi(T_1, T_2)$ $\frac{Q_3}{Q_2} = \Psi(T_2, T_3)$ $\frac{Q_3}{Q_1} = \Psi(T_1, T_3)$

por outro lado,

$$\Psi(T_1, T_3) = \frac{Q_3}{Q_1} = \frac{Q_2 Q_3}{Q_1 Q_2} = \Psi(T_1, T_2) \Psi(T_2, T_3)$$

Nota-se que o lado esquerdo dessa equação é função apenas de $T_1 e T_3 e$ não de T_2 e, portanto, o lado direito deve também ser função apenas de $T_1 e T_3$. Disso pode-se concluir que a forma da função ψ , deve ser tal que

$$\Psi(T_1, T_2) = \frac{f(T_2)}{f(T_1)}$$
$$\Psi(T_2, T_3) = \frac{f(T_3)}{f(T_2)}$$
$$\Psi(T_1, T_3) = \frac{f(T_3)}{f(T_1)}$$

ou seja, da Eq.2.1a temos

$$\frac{Q_l}{Q_h} = \frac{f(T_l)}{f(T_h)}$$
Eq.2.2

Existem muitas relações que satisfazem esta equação, uma delas, proposta por Kelvin, é a relação:

$$\frac{Q_h}{Q_l} = \frac{T_h}{T_l}$$
Eq.2.3

Esta equação conduz a uma eficiência $\eta = 1 - \frac{T_l}{T_h}$, um resultado surpreendente, uma vez que ele estabelece que independente da forma que a máquina térmica é projetada, sua eficiência vai depender exclusivamente dos níveis de temperatura nos quais ela opera. Uma vez que máquinas industriais normalmente operam em meio a limitações de projeto, perda de calor, fricção e outros fatores que reduzem o seu desempenho, uma eficiência próxima a 100% só seria possível se essa máquina operasse com o reservatório T_l a uma temperatura próxima do zero absoluto e com T_h a uma alta temperatura. A conclusão geral que se chega, é que, embora calor e trabalho sejam

equivalentes no sentido de que ambos são formas de energia, a conversão de energia mecânica em energia calorífica é espontânea e pode ocorrer completamente a qualquer temperatura, ao passo que o processo inverso, pode converter apenas parte dessa energia calorífica em trabalho. Assim, sendo T_h e T_l constantes e o ciclo reversível, segue-se que:

$$\int \frac{\delta Q}{T} = \frac{Q_h}{T_h} - \frac{Q_l}{T_l} = 0$$

e:

$$\int \delta Q \ge 0 \quad \text{e} \quad \int \frac{\delta Q}{T} = 0 \qquad \text{Eq.2.4a}$$

Um resultado válido para todas as máquinas térmicas operando em ciclos reversíveis. Conforme observado anteriormente, na maioria dos processos estudados, o maior interesse diz respeito àqueles que envolvem mudanças de estado. Dessa forma, retomando como modelo o processo representado pela Fig. A2, podemos escrever com base na Eq.2.4a que:

Indo por A e voltando por B

$$\int_{1A}^{2A} \frac{\delta Q}{T} + \int_{2B}^{1B} \frac{\delta Q}{T} = 0$$

Indo por A e voltando por C

$$\int_{1A}^{2A} \frac{\delta Q}{T} + \int_{2C}^{1C} \frac{\delta Q}{T} = 0$$

Subtraindo-se essas duas equações, temos:

$$\int_{1B}^{2B} \frac{\delta Q}{T} = \int_{2C}^{1C} \frac{\delta Q}{T}$$

Novamente pode-se concluir que a quantidade $\left(\int \frac{\delta Q}{T}\right)$ é a mesma, independente do caminho percorrido pelo sistema. Neste ponto, torna-se conveniente definir uma nova propriedade termodinâmica, a qual chamaremos de entropia (S). Assim:

$$\frac{\delta Q}{T} = dS$$
 Eq.2.6a

Da Eq.1.7a, obtemos

$$TdS = dU + PdV$$
 ou
 $dU = TdS - PdV$ Eq.2.7a

Dessa forma, à pressão e temperatura constantes a Eq.2.7a pode ser integrada fornecendo:

$$W_{REV} = TS_2 - TS_1 + U_1 - U_2 = (U_1 - TS_1) - (U_2 - TS_2)$$
 e:

 $\delta W_{REV} = PdV$

A quantidade (U - TS) define uma outra propriedade termodinâmica, a Energia livre de Helmholtz (A)

A = U - TS Eq.2.8

Observemos agora o processo abaixo, Fig.A-7:



Figura A7. Representação esquemática de um processo irreversível de compressãodescompressão. Parte do calor liberado para a vizinhança do volume de controle não é absorvido na etapa seguinte.

Aqui o processo não é completamente reversível, uma vez que ${}_{1}^{2}Q \neq {}_{2}^{3}Q$. Portanto, pode-se concluir que parte do trabalho aplicado no sistema não pôde ser revertida pelo mesmo na etapa seguinte, gerando assim um trabalho irreversível, ou perdido W_{L} . Logo, podemos escrever que:

$$\delta W_{1,2} = PdV = \delta W_{REV} + \delta W_{L}$$

onde $\delta W_{REV} = \delta W_{2,3}$

assim
$$\delta W_{REV} = PdV - \delta W_L$$
 Eq.2.9a

Lembrando que $\delta W_{REV} = TdS - dU$, obtém-se:

 $PdV - \delta W_L = TdS - dU$

Integrando-se a pressão e temperatura constantes:

$$\int_{1}^{2} \delta W_{L} = \int_{1}^{2} P dV + \int_{1}^{2} dU - \int_{1}^{2} T dS$$
$$W_{L} = (PV_{2} + U_{2} - TS_{2}) - (PV_{1} + U_{1} - TS_{1})$$

ou da Eq.1.9a:

$$W_L = (H_2 - TS_2) - (H_1 - TS_1)$$

A quantidade (H - TS) associada ao trabalho irreversível é definida como a energia livre de Gibbs (G) e é também uma propriedade termodinâmica que depende unicamente dos estados inicial e final do sistema. Assim:

$$G = H - TS$$
 Eq.3.1a

Derivando as equações 1.9a, 2.8a e 3.1a pode-se obter, respectivamente:

•
$$dH = dU + PdV + VdP$$
 e:

$$dU = TdS - PdV$$

logo:

$$dH = TdS + VdP$$
Eq.3.2a
$$dA = dU - TdS - SdT$$
e:
$$dA = -PdV - SdT$$
Eq.3.3a
$$dG = dH - TdS - SdT$$

dH = TdS + VdP

dessa forma,

$$dG = VdP - SdT$$
 Eq.3.4a

Matematicamente, uma variável Z que seja uma função de X e de Y, tal que Z = f(X,Y), pode ser escrita da seguinte forma:

$$dZ = \left(\frac{\partial Z}{\partial X}\right)_{Y} dX + \left(\frac{\partial Z}{\partial Y}\right)_{X} dY$$
 Eq.3.5a

onde $\left(\frac{\partial Z}{\partial X}\right)_{Y}$ é a derivada parcial de Z em relação a X e Y constante.

Assim, tomando-se $M = \left(\frac{\partial Z}{\partial X}\right)_Y$ $e N = \left(\frac{\partial Z}{\partial Y}\right)_X$, a Eq.3.5a pode ser rescrita

dZ = MdX + NdY

Observe também que:

$$\frac{\partial M}{\partial Y} = \frac{\partial N}{\partial X}$$
Eq.3.6a

Com base nas equações 3.5a e 3.6a, as seguintes relações termodinâmicas, também conhecidas como relações de Maxwell, podem ser escritas:

•
$$dU = TdS - PdV$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial U}{\partial S} \end{pmatrix}_{V} = T; \left(\frac{\partial U}{\partial V} \right)_{S} = -P \\ \left(\frac{\partial T}{\partial V} \right)_{S} = -\left(\frac{\partial P}{\partial S} \right)_{V}$$
 e:

•
$$dH = TdS + VdP$$
$$\begin{pmatrix} \frac{\partial H}{\partial S} \end{pmatrix}_{P} = T; \begin{pmatrix} \frac{\partial H}{\partial P} \end{pmatrix}_{S} = V$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial T}{\partial P} \end{pmatrix}_{S} = \begin{pmatrix} \frac{\partial V}{\partial S} \end{pmatrix}_{P}$$

$$dA = -PdV - SdT$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial A}{\partial V} \end{pmatrix}_{T} = -P; \begin{pmatrix} \frac{\partial A}{\partial T} \end{pmatrix}_{V} = -S$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial P}{\partial T} \end{pmatrix}_{V} = \begin{pmatrix} \frac{\partial S}{\partial V} \end{pmatrix}_{T}$$

$$dG = VdP - SdT$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial G}{\partial P} \end{pmatrix}_{T} = V; \begin{pmatrix} \frac{\partial G}{\partial T} \end{pmatrix}_{P} = -S$$

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial V}{\partial T} \end{pmatrix}_{P} = -\begin{pmatrix} \frac{\partial S}{\partial P} \end{pmatrix}_{T}$$

$$e:$$

Tendo em mente que uma propriedade extensiva depende da massa da substância em análise, enquanto que uma propriedade intensiva é independente da mesma, e que para um sistema de massa fixa nós acabamos de concluir que:

$$dU = TdS - PdV$$

Nota-se que T é uma propriedade intensiva ou função potencial associada à propriedade extensiva entropia S, e que P é, por sua vez, uma propriedade intensiva associada ao volume. No caso geral, qualquer propriedade extensiva \mathcal{X} é função da pressão e da temperatura, assim como do número de moles de cada componente. Para uma mistura de dois componentes A e B, tal que A é convertido em B no decorrer do processo, pode-se concluir que toda propriedade extensiva será função também dos números de moles de cada componente nessa mistura, logo:

 $\chi = f(P,T,n_A,n_B)$

assim:

$$d\mathcal{X} = \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial P}\right)_{T, n_A, n_B} dP + \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial T}\right)_{P, n_A, n_B} dT + \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_A}\right)_{P, T, n_B} dn_A + \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_B}\right)_{P, T, n_A} dn_B$$

Tomando P e T constantes

$$d\mathcal{X} = \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B} + \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_B}\right)_{P,T,n_A} dn_B$$
Eq 3.7a

Dessa equação pode-se concluir que a propriedade extensiva \mathcal{X} é função apenas da massa quando *P* e *T* são constantes, e que $\left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B}$ é uma propriedade independente da massa, ou

seja, intensiva. A equação 3.7a pode, então, ser reescrita:

$$d\mathcal{X} = \overline{\mathcal{X}}_A dn_A + \overline{\mathcal{X}}_B dn_B$$
$$\overline{\mathcal{X}}_A \quad e \quad \overline{\mathcal{X}}_B \text{ são definidos como propriedades parciais molares de uma substância tomadas$$

a temperatura e pressão constante, de maneira que:

$$\overline{\mathcal{X}}_{A} = \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_{A}}\right)_{P,T,n_{B}} e \quad \overline{\mathcal{X}}_{B} = \left(\frac{\partial \mathcal{X}}{\partial n_{B}}\right)_{P,T,n_{A}}$$

mas:

$$dU = TdS - PdV$$

Logo, para uma mistura de dois componentes, A e B, pode-se escrever que:

 $U = f(S, V, n_A, n_B)$ e segue que:

$$dU = TdS - PdV + \left(\frac{\partial U}{\partial n_A}\right)_{S,V,n_B} dn_A + \left(\frac{\partial U}{\partial n_B}\right)_{S,V,n_A} dn_B$$

Lembrando que dG = VdP - SdT e sendo $G = f(P,T,n_A,n_B)$, conclui-se que:

$$dG = VdP - SdT + \left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B} dn_A + \left(\frac{\partial G}{\partial n_B}\right)_{P,T,n_A} dn_B$$

Pode-se obter ainda de maneira similar as demais relações:

$$\left(\frac{\partial U}{\partial n_A}\right)_{S,V,n_B} = \left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B} = \left(\frac{\partial A}{\partial n_A}\right)_{T,V,n_B} = \left(\frac{\partial H}{\partial n_A}\right)_{S,P,n_B}$$

Dessas quatro relações equivalentes, apenas aquela relativa à energia livre de Gibbs é tomada à pressão e temperatura constantes e, portanto, assim como *T* e *P* são propriedades intensivas ou funções potenciais associadas as propriedades extensivas *S* e *V* na Eq. 2.7a, a quantidade $\left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B} = \overline{G}_A$ é, por sua vez, a energia livre de Gibbs parcial molar do componente *A*

na mistura, uma função potencial associada à massa também conhecida como potencial químico μ_A . Logo:

$$dU = TdS - PdV + \overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B$$
 Eq.3.8a

$$dH = TdS + VdP + \overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B$$
 Eq.3.9a

$$dG = VdP - SdT + \overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B$$
 Eq.4.0a

$$dA = -PdV - SdT + \overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B$$
 Eq.4.1a

Para uma substância pura gasosa em condições ideais à temperatura constante, da Eq.3.4a, vem que:

$$dG = VdP$$
 e tomando $V = \frac{RT}{P}$ \Rightarrow $dG = RTd \ln(P)$

Definindo-se a fugacidade de uma substância pura não ideal A, f_A , como:

$$dG_A = RTd\ln(f_A)$$
 tal que $\lim_{P \to 0} \frac{f_A}{P} = 1$ Eq.4.2a

Isto é, quando P \rightarrow 0, pode ser admitido o comportamento de gás ideal e $f_A \approx P_{.}$ A fugacidade do componente A em uma mistura, \bar{f}_A , é definida como:

$$d\overline{G}_A = RTd \ln(\overline{f}_A)$$
 tal que $\lim_{P \to 0} \frac{\overline{f}_A}{y_A P} = 1$ Eq.4.3a

Sendo y_A a fração molar da espécie A, segue-se que se $P \rightarrow 0 \Rightarrow \bar{f}_A \approx y_A P$.

Da equação 4.0a pode-se obter as seguintes relações de Maxwell

$$\left(\frac{\partial \overline{G}_A}{\partial P}\right)_{T,n_A,n_B} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_A}\right)_{P,T,n_B} = \overline{V}_A \qquad \Rightarrow \qquad d\overline{G}_A = \overline{V}_A dP$$

onde \overline{V}_A é o volume parcial molar de A na mistura

Tomando-se V_A como o volume do componente A puro nas mesmas condições de T e P da mistura, as equações 4.2a e 4.3a podem ser reescritas como:

$$RTd \ln(\bar{f}_A) = \overline{V}_A dP$$
 $RTd \ln(f_A) = V_A dP$

Subtraindo-se essas duas equações, temos:

$$RTd \ln(\frac{\bar{f}_A}{f_A}) = (\bar{V}_A - V_A)dP$$
 Eq.4.4a

Integrando-se a Eq.4.4a a partir de $P \approx 0$, de tal forma que o comportamento ideal (*) possa ser assumido, até uma determinada pressão P, obtemos:

$$\int_{ln(\frac{\bar{f}_A}{f_A})}^{ln(\frac{\bar{f}_A}{f_A})} RTd\ln(\frac{\bar{f}_A}{f_A}) = \int_0^P (\overline{V}_A - V_A) dP$$

$$RT\ln(\frac{\bar{f}_A}{y_A f_A}) = \int_0^P (\overline{V}_A - V_A) dP$$
Eq.4.5a

Esta equação diz que se $\overline{V}_A = V_A$, tal como ocorre em misturas e soluções ideais, então

$$ln(\frac{\bar{f}_A}{y_A f_A}) = 0 \qquad \Rightarrow \qquad \bar{f}_A = y_A f_A$$

Esta expressão é também referida como a lei de Lewis-Randall para soluções ideais. Tomando novamente a Eq.4.3a e integrando-a a partir de um estado padrão, podemos obter:

$$\int_{\overline{G}_{A}^{o}}^{G_{A}} d\overline{G}_{A} = \int_{\overline{f}_{A}^{o}}^{f_{A}} RTd\ln(\overline{f}_{A}) \implies \overline{G}_{A} = \overline{G}_{A}^{0} + RT\ln(\frac{\overline{f}_{A}}{y_{A}f_{A}^{o}})$$
Eq.4.6a

lembrando que dG = dH - TdS, chega-se a $\overline{G}_A = \overline{H}_A - T\overline{S}_A$

logo
$$\overline{G}_A = \overline{H}_A^o - T\overline{S}_A^o + RT \ln(\frac{f_A}{y_A f_A^o})$$

Assumindo um comportamento ideal à pressão padrão, pode-se provar que:

$$\overline{H}_{A}^{o} = H_{A}^{o}$$
 e $\overline{S}_{A}^{o} = S_{A}^{o} - Rln(y_{A})$

de onde obtém-se:

$$\overline{G}_A = G_A^o + RT \ln(\frac{\overline{f}_A}{f_A^o})$$
 Eq.4.7a

Definindo-se a atividade de um componente A numa mistura como $a_A = \frac{f_A}{f_A^o}$ chegamos a:

$$G_A = G_A^o + RT \ln(a_A)$$

Consideremos agora, uma mistura de substâncias que existam nas condições de equilíbrio químico, a uma dada temperatura T e pressão P, e que tais substâncias possam reagir segundo o mecanismo dado pelas reações independentes:

reação 1
$$v_A A + v_B B \leftrightarrow v_c C + v_D D$$

reação 2 $v_A A + v_L L \leftrightarrow v_M M + v_N N$

No equilíbrio, à temperatura e pressão constantes, dG = 0 e a Eq.4.0a se reduz a:

$$\overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B + \overline{G}_C dn_C + \overline{G}_D dn_D + \overline{G}_L dn_L + \overline{G}_M dn_M + \overline{G}_N dn_N = 0$$
 Eq.4.8a

Neste ponto, deve-se notar que todo decréscimo no número de moles dos componentes à esquerda é seguido de um acréscimo no número de moles dos componentes à direita das reações de equilíbrio 1 e 2 em proporções estequiometricamente definidas. Dessa forma, a utilização do parâmetro grau de extensão de reação X_j , surge como uma forma de se quantificar o consumo ou a produção de um dado componente *i* em uma reação *j* a partir de uma dada concentração inicial desta espécie, portanto, para as espécies em questão, obtém-se:

$$dn_A = v_A X_1$$
 ou de uma forma mais geral $dn_i = \sum_j v_{ij} X_j$

Com base nestas últimas expressões e na Eq.4.7a tomadas para todas as espécies consideradas nas reações de equilíbrio 1 e 2, pode-se agora reescrever a Eq.4.8a e reagrupar seus termos da seguinte maneira:

$$dX_{1}(\Delta G_{1}^{o} + RT \ln(\frac{a_{C}^{v_{C}} a_{D}^{v_{D}}}{a_{A}^{v_{A}} a_{B}^{v_{B}}})) = -dX_{2}(\Delta G_{2}^{o} + RT \ln(\frac{a_{M}^{v_{M}} a_{N}^{v_{N}}}{a_{A}^{v_{A}} a_{L}^{v_{L}}}))$$
Eq. 4.9a

onde

$$\Delta G_1^o = v_C \overline{G}_C^o + v_D \overline{G}_D^o - v_A \overline{G}_A^o - v_B \overline{G}_B^o \quad e \qquad \Delta G_2^o = v_M \overline{G}_M^o + v_N \overline{G}_N^o - v_A \overline{G}_A^o - v_L \overline{G}_L^o$$

O fato de as reações 1 e 2 serem independentes faz com que dX_1 e dX_2 variem de maneira independente um do outro para cada reação. Segue que no equilíbrio, ambos os termos entre parênteses devem ser nulos. Logo:

$$-\frac{\Delta G_1^o}{RT} = ln(\frac{a_C^{\nu_C} a_D^{\nu_D}}{a_A^{\nu_A} a_B^{\nu_B}}) \quad e \quad -\frac{\Delta G_2^o}{RT} = ln(\frac{a_M^{\nu_M} a_N^{\nu_N}}{a_A^{\nu_A} a_L^{\nu_L}})$$

Podemos, finalmente, definir K_1 e K_2 como as constantes de equilíbrio para as reações 1 e 2 obtendo

$$K_{1} = \frac{a_{C}^{\nu_{C}} a_{D}^{\nu_{D}}}{a_{A}^{\nu_{A}} a_{B}^{\nu_{B}}} \qquad \text{e} \qquad K_{2} = \frac{a_{M}^{\nu_{M}} a_{N}^{\nu_{N}}}{a_{A}^{\nu_{A}} a_{L}^{\nu_{L}}}$$
Eq.5.0a

A Eq. 4.9a pode ainda ser expressa de uma forma mais geral para uma sistema multirreacional consistindo de M espécies químicas, no qual \Re reações independentes ocorrem em fase única por meio da forma derivada da equação de Gibbs-Duhem à temperatura e pressão constantes como segue:

$$dG = \sum_{j=1}^{\Re} \left[\Delta G_j^o + RT \ln \left(\prod_{i=1}^{M} (a_i)^{v_{ij}} \right) \right] dX_j$$

Da mesma forma, pode-se obter uma expressão geral para a Eq. 5.0a, assim:

$$K_{aj} = \prod_{i=1}^{M} a_i^{v_{ij}}$$

Avanços nesses conceitos, assim como uma abordagem mais completa e generalizada dessas últimas relações para soluções de eletrólitos, e que é aplicada nos trabalhos aqui realizados, podem ser obtidas a partir das referências citadas abaixo e demais correlacionadas às mesmas.

Referências:

Fundamentals of Classical Thermodynamics – G. J. van Wylen & R. E. Sonntag – editora Edgard Blücher.

Chemical and Engineering Thermodynamics – Stanley I. Sandler. 1999. Editora John Wyley & Sons. Nova Iorque.

Physical Chemistry – R. S. Berry, Stuart A. Rice & John Ross. 2000. Editora Oxford. Nova Iorque.

APÊNDICE B

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DE SISTEMAS INTERDEPENDENTES E MULTIACOPLADORES

O desenvolvimento termodinâmico de sistemas multirreacionais interdependentes por meio de parâmetros macroscópicos que expressem o comportamento microscópico de um grupo de espécies com uma dada característica é, em geral, conduzido de forma a se obter uma descrição quantitativa ou qualitativa desse grupo, dependendo da propriedade a ser analisada. O presente apêndice apresenta uma descrição detalhada desses processos e das equações provenientes dos mesmos que são utilizadas nessa dissertação. Assim, se o objetivo desse desenvolvimento termodinâmico é o de fornecer parâmetros macroscópicos referentes unicamente à quantidade das espécies presentes em solução que compõe um determinado grupo, não importando portanto as propriedades individuais de cada uma das distintas espécies desse grupo, estas são, por sua vez, assumidas indistinguíveis e hipoteticamente idênticas. Por outro lado, se as propriedades a serem analisadas por meio de parâmetros macroscópicos forem função não apenas do número de espécies com uma dada característica mas também do número de ocorrências das distintas formas que compõe esse grupo e de seus respectivos estados energéticos, esses parâmetros deverão levar em conta a probabilidade de ocorrência das mesmas. Dessa forma, assume-se para esses casos que essas espécies são indistinguíveis porém com seus estados energéticos tomados de maneira discreta. Ao primeiro tipo de descrição dá-se o nome de *aparente* (Wyman, 1964), no entanto, visto estarmos assumindo nessa dissertação a designação 'aparente' para expressar a dependência dos parâmetros energéticos e de equilíbrio em relação ao pH, optou-se por denominar esse tipo de desenvolvimento macroscópico por *global (g)*. O segundo tipo de desenvolvimento envolve propriedades energéticas médias, uma vez que o mesmo provém da mecânica estatística no que diz respeito à teoria de 'ensemble' canônico para partículas dependentes. Assim, optou-se aqui por identificar esse tipo de descrição pelo sobrescrito (*av*) de '*average*'. Para tornar clara a diferença entre esses dois procedimentos e o tipo de informação que eles fornecem tomaremos como exemplo a Fig. B1 (a).

Figura B1



Figura B1. (a) Representação esquemática de um grupo de três espécies em equilíbrio. (b) Esquema de reações em paralelo que podem ser expressos segundo o parâmetro global x.

Nessa figura, um hipotético equilíbrio químico entre três espécies $a, b \in c$ é representado em termos dos conjuntos **A**, **B** e **C** de tal forma que temos nesse volume de controle uma mistura supostamente ideal de 33 espécies em equilíbrio (30 espécies c, 2 espécies b e uma a) interconvertíveis com base nas constantes $K_1 \in K_2$ para a situação de equilíbrio conforme mostrado na Fig. B1 (b). Assumindo-se que cada espécie a possui uma energia livre de Gibbs de reação, G_a , o estado energético das demais formas pode ser dado por

$$G_b = G_a - RT \ln(K_1)$$
 Eq. 1b

e

$$G_c = G_a - RT ln(K_2)$$
 Eq. 2b

Segundo o desenvolvimento macroscópico *global*, se as espécies pertencentes aos conjuntos **B** e **C** forem indistinguíveis elas podem ser expressas por meio de um único componente x, conforme representado na Fig. B1 (b), tal que:

$${}^{g}K_{x} = \frac{{}^{g}n_{x}}{n_{a}} = \frac{n_{b} + n_{c}}{n_{a}} = K_{1} + K_{2}$$
 Eq. 3b

Isso por sua vez implica que:

$${}^{g}G_{r} = G_{a} - RT ln({}^{g}K_{r}) = G_{a} - RT ln(K_{1} + K_{2})$$
 Eq. 4b

Note que nesse procedimento as espécies *b* e *c*, assumidas indistinguíveis, são, também, consideradas idênticas uma vez que aparecem como uma simples soma na constante macroscópica ${}^{g}K_{x}$, Eq. 3b, logo, essa descrição é fiel apenas ao número de espécies em solução e não carrega nenhuma informação acerca dos estados energéticos predominantes em solução, sendo, dessa forma, útil para análises quantitativas de um grupo de espécies por meio de parâmetros macroscópicos. Assim, se retirarmos ao acaso uma espécie dessa solução pertencente aos conjuntos **B** e **C** repetidas vezes, a energia média obtida para esse grupo pode não expressar o valor fornecido pela Eq. 4b. Para demonstrar isso analisaremos antes o segundo procedimento referente a uma descrição média (*av*) que leva em conta a proporção com que as distintas espécies com a mesma característica ocorrem em solução assim como as suas propriedades energéticas discretas. Essa metodologia consiste em obter uma descrição macroscópica de um grupo de espécies em solução interconvertíveis ou não que forneça informações qualitativas

acerca desse grupo no que diz respeito aos estados médios de energia das espécies que o compõe, assim, a energia G_x desse sistema pode ser expressa segundo seus parâmetros médios como:

$${}^{av}G_x = \frac{n_b}{n_b + n_c}G_b + \frac{n_c}{n_b + n_c}G_c = \frac{K_1}{K_1 + K_2}G_b + \frac{K_2}{K_1 + K_2}G_c = w_bG_b + w_cG_c$$
 Eq. 5b

Das Eqs. 1b e 2b podemos reescrever a Eq. 5b da seguinte forma:

$$\Rightarrow \quad {}^{av}G_x = W_b \left(G_a - RT \ln(K_1) \right) + W_c \left(G_a - RT \ln(K_2) \right)$$
$$\Rightarrow \quad {}^{av}G_x = G_a - RT \ln(K_1^{w_b} K_2^{w_c})$$
Eq. 6b

De onde obtém-se:

$$^{av}G_x - G_a = -RT ln(K_1^{w_b}K_2^{w_c}) = -RT ln(^{av}K_x)$$
 Eq. 7b

e;

$${}^{av}K_{x} = K_{1}^{w_{b}}K_{2}^{w_{c}} = \frac{n_{b}^{w_{b}}n_{c}^{w_{c}}}{n_{a}} = \frac{{}^{av}n_{x}}{n_{a}}$$
Eq. 8b

Essa constante média, conforme pode ser concluído da Eq. 5b, é função dos valores energéticos e do número de moles das espécies b e c em solução e, dessa forma, a probabilidade de ocorrência das mesmas pondera os parâmetros macroscópicos a serem obtidos para essa coleção. Um outro ponto a ser notado é que a constante dada pela Eq. 8b fornece valores intrínsecos médios entre as vias paralelas de consumo de a predominantes, sendo os mesmos obtidos por meio de uma média ponderada dos estados energéticos do grupo em análise, Eq. 5b.

Pode-se concluir ainda das Eqs. 3b e 8b que se os estados energéticos das espécies em análise forem idênticos, isto é $K_1=K_2=K$, então o número de moles de *b* e *c* em equilíbrio serão idênticos ($n_b=n_c$ e $w_b=w_c=0,5$) e consequentemente das Eqs. 4b e 6b obtém-se:

$${}^{g}G_{x} = G_{a} - RT \ln(K_{1} + K_{2}) = G_{a} - RT \ln(2K)$$
 Eq. 9b

$$^{av}G_x = G_a - RT\ln(K)$$
 Eq. 10b

Esses resultados fornecidos por essas duas equações tornam explícita a diferença entre essas metodologias normalmente descritas na literatura. Nota-se que o procedimento global (g) além de fornecer uma descrição correta do número de espécies em solução também carrega intrínsecamente a informação referente ao estado energético médio desse grupo em análise, possuem a mesma constante *K*, quando as espécies pertencentes ao mesmo grupo (espécies com a mesma característica) estiverem no mesmo estado energético. Já a descrição obtida em termos das propriedades médias (av) sempre vai fornecer o estado energético médio desse grupo e as suas respectivas constantes de equilíbrio predominantes independente do fato das distintas espécies que compõe esse grupo possuírem ou não o mesmo estado energético. No que diz respeito a igualdade entre as Eqs. 9b e 10b conclui-se que ela ocorre quando w_b ou w_c tende a zero, isto é, quando apenas uma das possíveis reações paralelas predomina.

Dessa forma, se estivermos analisando resultados experimentais ou parâmetros energéticos como o índice de efeito e assimetria, que são função das propriedades energéticas médias das espécies em questão, a utilização da descrição global não é recomendada, devendo-se dar preferência à utilização de parâmetros médios. Se esse tipo de dependência dos parâmetros macroscópicos não ocorre, como por exemplo para uma curva de saturação de proteína pelo

ligante onde apenas o número de sítios saturados determina o grau de saturação, independente dos estados energéticos de cada espécie, utiliza-se uma descrição global.

Um ponto interessante acerca desses dois procedimentos e bastante útil durante a modelagem termodinâmica de proteínas acopladores é que se um determinado grupo de espécies distintas e com a mesma característica possuem o mesmo nível energético em solução, pode-se ao mesmo tempo obter uma descrição global e média em termos macroscópicos corrigindo-se a constante global de seu fator estatístico que corresponde ao número de vias paralelas distintas ou ao número de espécies distintas com a mesma característica (no caso da Eq. 9b, o número 2 dentro do logaritmo representa esse fator estatístico), obtendo, assim, a constante *K* intrínseca de cada reação e que corresponde também à constante média. Excepcionalmente para essas condições a constante *global* de equilíbrio é referida na literatura como constante *estatística* e a constante *média* como *intrínseca*, logo:

$$G_x$$
 (estat) = $G_a - RT ln \left[\left(\begin{array}{c} coeficiente \\ estat (stico) \end{array} \right) K \right]$

ou;

$$K_x$$
 (estat) = $\begin{pmatrix} coeficiente \\ estatístico \end{pmatrix} K$

Na Fig. B1 (b), setas cinzas, esse coeficiente estatístico é igual a 2 e para um caso geral como o representado pelas setas pretas é igual a *s*. A seguir é mostrado na Fig. B2 a extensão desses conceitos para proteínas acopladoras com *n* subunidades e um sítio ativo por subunidade, sendo ainda explicitado nessa figura os diversos intermediários durante o acoplamento do ligante a uma hemoglobina tetramérica que são responsáveis pelo aparecimento dos fatores estatísticos

durante a sua modelagem termodinâmica. Nessa figura, as diferentes formas isoméricas provenientes do processo de oxigenação de uma Hb são mostradas em relação as suas possíveis configurações. De maneira geral, nota-se que para uma proteína contendo n sítios são possíveis 2^n estruturas se cada uma dessas combinações dos ligantes produzirem uma estrutura quaternária distinta, assim, para uma Hb com n = 4, o número total de possíveis estruturas é igual a 16 conforme mostrado na Fig. B2.

Um outro ponto que pode ser observado nessa figura é que para cada estado de saturação pelo ligante o número total de possíveis espécies isoméricas (s_i) é dado por um binômio de Newton tal que:



Figura B2. (a) Representação esquemática das possíveis espécies intermediárias durante o acoplamento do ligante a uma hemoglobina tetramérica em termos de seus parâmetros intrínsecos e estatísticos.

$$s_l = \binom{n}{l} = \frac{n!}{l!(n-l)!}$$
Eq. 11b

onde *l* é o número de ligantes que pode ser combinado à proteína.

Assim, para n = 4 e l=0, 1, 2, 3 e 4 temos respectivamente $s_l = 1, 4, 6, 4$ e 1 que juntos irão representar os coeficientes estatísticos de cada etapa. Deve-se notar também nessa figura que para cada uma dessas possíveis combinações do mesmo número de ligantes, as subunidades livres de cada isômero podem em princípio apresentar afinidades distintas pelo ligante entre si e entre aquelas presentes nos demais isômeros. Para essas situações o número de estados de afinidade pelo ligante é maior que o número de estruturas uma vez que o acoplamento do ligante a um sítio específico pode gerar mudanças estruturais que venham a alterar de maneira distinta a afinidade expressa por cada uma das subunidades livres. Entretanto, se essa diferença de afinidade não ocorre entre as subunidades livres pertencentes a mesma molécula mas somente entre essas e as pertencentes aos demais isômeros esse número se reduz a 2^n -1, que corresponde ao número de possíveis estruturas subtraídas da forma completamente saturada que não possui sítios livres. Continuando esse processo de simplificação conclui-se que se não ocorrem diferenças significativas estruturais e de afinidade pelo ligante entre os diferentes isômeros e suas subunidades livres, então o número total de estruturas possíveis e estados de afinidade se reduz a n e n-1 respectivamente. Nesses casos esse sistema pode então ser expresso em termos de suas constantes estatísticas e intrínsecas de cada etapa como segue:

$$K_{j}(estat) = \frac{\binom{n}{j}}{\binom{n}{j-1}} K_{j} = \frac{s_{j}}{s_{j-1}} K_{j} = \frac{n-j+1}{j} K_{j}$$
Eq. 12b

onde j= 1, 2, ..., *n*-1, *n*.

De onde podemos obter por meio de parâmetros macroscópicos informações globais e médias acerca desse processo de acoplamento e das espécies que o compõe para as condições consideradas. Assim, a partir da Fig. 2B e da Eq. 12b, chega-se a:

$$K_1(estat) = 4K_1$$
 $K_2(estat) = \frac{6}{4}K_2 = \frac{3}{2}K_2$

$$K_3(estat) = \frac{4}{6}K_3 = \frac{2}{3}K_3$$
 $K_4(estat) = \frac{1}{4}K_4$

Que são as constantes estatísticas para cada etapa do acoplamento do oxigênio. A utilização inadequada desses conceitos pode conduzir a erros durante a análise de dados experimentais como consequência de uma discordância entre o tipo de descrição utilizada e a natureza do fenômeno considerado. Assim, uma constante global em princípio não poderia ser utilizada para calcular parâmetros energéticos de um grupo de espécies em níveis claramente distintos de energia como aqueles considerados para as formas tensa e relaxada e para processos de dissociação por mais de uma via. Nesses casos, um novo problema surge durante a modelagem termodinâmica desses processos devido a presença dessas novas espécies ou vias de reação. Para acessar a descrição distinta desses sistemas frente aos parâmetros macroscópicos considere a Fig. 3B.

Figura B3



Figura B3. Representação esquemática de um grupo de espécies em equilíbrio com estados distintos de protonação indicados pelo sobrescrito r e r+1 e de saturação.

No processo descrito nessa figura ocorre o acoplamento do ligante a uma proteína com formação de duas espécies tautoméricas em estados distintos de protonação, $r \in r + 1$, num equilíbrio químico similar ao normalmente observado para as formas $T \in R$, conclui-se que os parâmetros macroscópicos além de considerar as vias paralelas de formação de isômeros quanto ao número de ligantes deverão também levar em conta o número de formas tautoméricas assumidas. Assim, se ${}^{r}K_{1,1} = {}^{r}K_{1,2} = \dots = {}^{r}K_{1,s} = {}^{r}K_{1}$ e sendo ${}^{r+1}K_{1,1} = {}^{r+1}K_{1,2} = \dots = {}^{r+1}K_{1,s} = {}^{r+1}K_{1,s}$ onde ${}^{r}K_{1} \in {}^{r+1}K_{1}$ são as constantes intrínsecas das formas $r \in r+1$ respectivamente, podemos obter para o processo de oxigenação desses dois tautômeros com base na Eq. 12b as seguintes constantes estatísticas:

$${}^{r}K_{j}(estat) = \frac{s_{j}}{s_{j-1}} {}^{r}K_{j}$$
 Eq. 13

e

$$^{r+1}K_{j}(estat) = \frac{s_{j}}{s_{j-1}} {}^{r+1}K_{j}$$
 Eq. 14b

onde j = 1 e $s_{j-1} = 1$.

Note que essas duas constantes são as constantes estatísticas para essa etapa do acoplamento do ligante a cada uma das formas r e r+1 respectivamente. Se assumirmos agora que os tautômeros r e r+1 são indistinguíveis em solução, podemos obter uma descrição desse processo sobre um ponto de vista ainda mais macroscópico com base no procedimento seguido para a obtenção da Eq. 3b, tal que:

^g
$$K_j = {}^r K_j (estat) + {}^{r+1} K_j (estat)$$
 Eq. 15b

Da mesma forma pode-se expressar estas constantes ${}^{r}K_{j}e^{r+1}K_{j}$ em termos de seus valores médios conforme a metodologia descrita para a obtenção da Eq. 8b, assim,

$$^{av}K_{j} = (^{r}K_{j}(estat))^{w_{r}}(^{r+1}K_{j}(estat))^{w_{r+1}}$$
 Eq. 16b

tal que

$$w_r = \frac{{}^r K_j (estat)}{{}^r K_j (estat) + {}^{r+1} K_j (estat)};$$
 e $w_r = 1 - w_{r+1}$

Segue que se ${}^{r}K_{j} = {}^{r+1}K_{j} = K_{j}$, então ${}^{r}K_{j}(estat) = {}^{r+1}K_{j}(estat) = K_{j}(estat)$ e $w_{r} = w_{r+1} = 0,5$, logo:

$${}^{g}K_{i} = 2K_{i}(estat) = 2^{av}K_{i}$$
 Eq. 17b

Essa última simplificação normalmente não é observada, no entanto ela é útil para exemplificar as características distintas de cada uma dessas descrições. Nota-se desses processos que além das descrições globais e médias totais dadas pelas Eqs. 15b e 16b assim como as suas condições de equivalência expressa pela Eq. 17b, existem também constantes parciais para cada tautômero descritas pelas Eqs. 13b e 14b. De maneira geral podemos ter constantes médias e globais obtidas a partir dos valores estatísticos de ${}^{r}K_{j}(estat) e^{r+1}K_{j}(estat)$, Eq. 17b, ou de maneira análoga a partir dos valores intrínsecos dados por ${}^{r}K_{j}e^{r+1}K_{j}$.

Os resultados obtidos para cada uma dessas distintas constantes globais e médias normalmente observadas na literatura foram utilizados na construção das Figs. 4, 8 (A e C) e 9 dessa dissertação para ilustrar as diferenças entre cada uma dessas metodologias. Quanto aos processos de dissociação por mais de uma via, o desenvolvimento termodinâmico dos mesmos é apresentado na página 65 dessa dissertação da Eq. 32 à Eq. 35 para uma situação onde as formas agregadas constituem um grupo formado por duas espécies tautoméricas *T* e *R* que possuem cada uma duas vias possíveis de dissociação. A expressão desses sistemas em termos de constantes médias é apresentada para os parâmetros intrínsecos de cada etapa, os quais conduzem à Eq. 30 da pág. 65 e à Eq. 35 da pág. 69, entretanto, quando essas equações são obtidas com base nos seus valores estatísticos de cada etapa deve-se corrigir os valores intrínsecos do número de possíveis isômeros obtidos para o tetrâmero (n=4) e para o dímero (n=2) em questão.

Para finalizar, deve-se ter em mente que uma vez que uma descrição média visa prover informações acerca das propriedades energéticas médias das espécies consideradas e das vias predominantes com que um determinado processo ocorre, não há razão em se considerar os fatores estatísticos, assim, a descrição média obtida em termos dos parâmetros intrínsecos é a mais adequada para esse tipo de análise.

PROGRAMAS DESENVOLVIDOS

Programa 1

Descrição: Calcula curvas de oxigenação para Hb Humana e a respectiva distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína (inclui o processo de dissociação).

format long e; Temp=293; R=1.9872; Nt0=3.5e-5; Ni1=0.39; Ni2=0.63; Ni3=0.78; Ni4=0.08; Ni5=1; Ni6=0; Ni7=0; deltaGp1=-2012; deltaGp2=-3.691; deltaGp3=1260; deltaGp4=-8266; deltaGp5=24303; deltaGp6=-8400; deltaGp7=-8400; for a=1:10 ph=6+(a)/5;printf("%-24.15e\n",ph); deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl5=deltaGp5+Ni5*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph); k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;

```
k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
```

```
k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
```

nome=strcat("dados_y_sem_h2o_ph_",num2str(ph),".txt"); a_y_sem_h2o=fopen(nome,'w','native'); nome=strcat("dados_x_sem_h2o_ph_",num2str(ph),".txt"); a x sem h2o=fopen(nome,'w','native');

```
for b= 1:501
if(ph>=1 && ph<=4)
O2=(b-1)*2e-5 + 1e-15;
elseif(ph>4 && ph<=7)
O2=(b-1)*3e-6 + 1e-15;
elseif(ph>7 && ph<=10)
O2=(b-1)*1e-7 + 1e-15;
elseif(ph>10 && ph<=12)
O2=(b-1)*2e-8 + 1e-15;
elseif(ph>12 && ph<=14)
O2=(b-1)*1e-10 + 1e-15;
endif
```

```
k1=k1aux*O2;
k2=k2aux*O2;
k3=k2aux*O2;
k4=k4aux*O2;
k6=k6aux*O2;
k7=k7aux*O2;
```

```
Termo1=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
 Termo2=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
 Termo3=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
 x7=(-Termo2-sqrt(Termo2^2 -4*Termo1*Termo3))/(2*Termo1);
 x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
 x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
 x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
 x6=(x7*k7+x7)/k7;;
 x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
 x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
 ligante(b)=O2;
 eixo_y1(a,b)=Nt0 - x1 - x5;
 eixo_y2(a,b)=x1 - x2;
 eixo_y3(a,b)=x2-x3;
```

```
eixo_y4(a,b)=x3 -x4;
eixo_y5(a,b)=x4;
eixo_y6(a,b)=2*x5-x6;
eixo_y7(a,b)=x6-x7;
eixo_y8(a,b)=x7;
```

```
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y1(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y2(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y3(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y4(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y5(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y6(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y7(a,b));
fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y8(a,b));
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",ligante(b));
```

```
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x1);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x2);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x3);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x4);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x5);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x6);
fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e\n",x7);
```

endfor endfor

Programa 2

Descrição: Calcula distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação fixa de Hb Humana por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

global k1aux; global k2aux; global k3aux; global k4aux; global k5; global k6aux; global k7aux; global Nt0; global saturacao; format long e;

```
fsolve_options("tolerance",1e-40);
Temp=293;
R=1.9872;
Nt0=3.5e-5;
Ni1=0.45985;
                   #SHORT RANGE
Ni2=0.6575;
Ni3=0.9563;
Ni4=0.08478;
Ni5=1;
Ni6=0;
Ni7=0;
deltaGp1=-1393.973;
deltaGp2=198.8062;
deltaGp3=2777.06441;
deltaGp4=-8230.1575;
deltaGp5=44303;
deltaGp6=-8400;
deltaGp7=-8400;
#Ni1=0.394;
                   #LONG RANGE
#Ni2=0.6366;
#Ni3=0.795;
#Ni4=0.0811;
#Ni5=1;
#Ni6=0;
#Ni7=0;
#deltaGp1=-2012.424;
#deltaGp2=-3.69089;
#deltaGp3=1260.09987;
#deltaGp4=-8265.54072;
#deltaGp5=44303;
#deltaGp6=-8400;
#deltaGp7=-8400;
a_sat=fopen("saturacao.txt",'w','native');
 function y=f(x)
  global k1aux;
  global k2aux;
  global k3aux;
  global k4aux;
  global k5;
  global k6aux;
  global k7aux;
  global Nt0;
  global saturacao;
  O2=x(1);
  k1=k1aux*O2;
  k2=k2aux*O2;
```

```
k3=k2aux*O2;
  k4=k4aux*O2;
  k6=k6aux*O2;
  k7=k7aux*O2;
  if(O2 <= 0)
   y(1)=Inf;
  else
   2*k4*k2*k3;
   b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
   c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
   x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
   x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
   x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
   x6=(x7*k7+x7)/k7;;
   x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
   x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
   y(1)=(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0)-saturacao;
  endif
   endfunction
for i=1:101
 ph=1+(i-1)*(13)/100;
printf("%-24.15e\n",ph);
 saturacao=0.5;
 deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl5=deltaGp5+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
if(i==1)
  [O2,info]=fsolve("f",10^-13);
else
  [O2,info]=fsolve("f",O2);
```

```
endif
   k1=k1aux*O2;
   k2=k2aux*O2;
   k3=k2aux*O2;
   k4=k4aux*O2;
   k6=k6aux*O2;
   k7=k7aux*O2;
   a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2*k2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3
2*k4*k2*k3:
   b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
   c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
   x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
   x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
   x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
   x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
   x6=(x7*k7+x7)/k7;;
   x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
   x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
   fprintf(a_sat,"%-24.15e",ph);
```

```
fprintf(a_sat,"%-24.15e",log10(O2/(1.31e-6)));
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x1);
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x2);
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x3);
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x4);
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x5);
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x6);
fprintf(a_sat,"%-24.15e\n",x7);
endfor
```


Descrição: Calcula constantes de equilíbrio e distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação fixa de Hb Humana por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

```
format long e;
Temp=293;
R=1.9872;
Nt0=3.5e-5;
#Ni1=0.45985; #SHORT RANGE
#Ni2=0.6575;
#Ni3=0.9563;
#Ni4=0.08478;
```

```
#Ni5=1;
#Ni6=0;
#Ni7=0;
#deltaGp1=-1393.973;
#deltaGp2=198.8062;
#deltaGp3=2777.06441;
#deltaGp4=-8230.1575;
#deltaGp5=24303;
#deltaGp6=-8400;
#deltaGp7=-8400;
                 #LONG RANGE
Ni1=0.394;
Ni2=0.6366;
Ni3=0.795;
Ni4=0.0811;
Ni5=1;
Ni6=0;
Ni7=0;
deltaGp1=-2012.424;
deltaGp2=-3.69089;
deltaGp3=1260.09987;
deltaGp4=-8265.54072;
deltaGp5=44303;
deltaGp6=-8400;
deltaGp7=-8400;
a_k_ph=fopen("assimetria.txt",'w','native');
for a=1:101
 ph=6+6*(a-1)/100;
 printf("%-24.15e\n",ph);
 deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl5=deltaGp5+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
 k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
 k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
 k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
 k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
 k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
 k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
 k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
 O2=5e-5;
 k1=k1aux*O2;
 k2=k2aux*O2;
 k3=k2aux*O2;
 k4=k4aux*O2;
```

```
k6=k6aux*O2;
k7=k7aux*O2;
```

```
a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
 c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
 x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
 x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
 x6=(x7*k7+x7)/k7;;
 x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
 x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",ph);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k1aux);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k2aux);
 fprintf(a k ph,"%-24.15e",k3aux);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k4aux);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k5);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k6aux);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k7aux);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x1);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x2);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x3);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x4);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x5);
 fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x6);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e\n",x7);
endfor
```


Programa 4

Descrição: Calcula curvas de diluição para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação determinada de Hb Humana por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

global k1aux; global k2aux; global k3aux; global k4aux; global k5; global k6aux; global k7aux; global Nt0; global alfa; global saturacao; format long e; fsolve_options("tolerance",1e-25); Temp=293; R=1.9872; N0=1e-20; Ni1=0.45985; **#SHORT RANGE** Ni2=0.6575; Ni3=0.9563; Ni4=0.08478; Ni5=1; Ni6=0; Ni7=0; deltaGp1=-1393.973; deltaGp2=198.8062; deltaGp3=2777.06441; deltaGp4=-8230.1575; deltaGp5=24303; deltaGp6=-8400; deltaGp7=-8400; #Ni1=0.394; **#LONG RANGE** #Ni2=0.6366; #Ni3=0.795; #Ni4=0.0811; #Ni5=1; #Ni6=0; #Ni7=0; #deltaGp1=-2012.424; #deltaGp2=-3.69089; #deltaGp3=1260.09987; #deltaGp4=-8265.54072; #deltaGp5=44303; #deltaGp6=-8400; #deltaGp7=-8400; a_sat=fopen("dilui_sat.txt",'w','native'); for i=1:61 ph=6+(i-1)/10; printf("%-24.15e\n",ph); for d=1:90 Nt0=N0*(10^(d/3)); function y=f(x)global k1aux; global k2aux; global k3aux;

```
global k4aux;
 global k5;
  global k6aux;
  global k7aux;
 global Nt0;
  global saturacao;
 O2=x(1);
 k1=k1aux*O2:
 k2=k2aux*O2;
 k3=k2aux*O2;
 k4=k4aux*O2:
 k6=k6aux*O2;
 k7=k7aux*O2;
 if(O2 <= 0)
   y(1)=Inf;
 else
   a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
   b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
   c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
   x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
   x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
   x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
   x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
   x6=(x7*k7+x7)/k7;;
   x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
   x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
   y(1)=(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0)-saturacao;
  endif
   endfunction
   saturacao=0.6;
 deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl5=deltaGp5+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
```

```
k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
```

```
k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
k1=k1aux*O2;
k2=k2aux*O2;
k3=k2aux*O2:
 k4=k4aux*O2:
k6=k6aux*O2;
k7=k7aux*O2;
 a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
 b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
 c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
 x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
 x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
 x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
 x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
 x6=(x7*k7+x7)/k7;;
 x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
 x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
alfa=x5/Nt0;
fprintf(a_sat,"%-24.15e",log10(Nt0));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",alfa);
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",(Nt0-x1-x5)/(Nt0-x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x1-x2)/(Nt0-x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x2-x3)/(Nt0-x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x3-x4)/(Nt0-x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",x4/(Nt0-x5));
 fprintf(a sat, "%-24.15e", (2*x5-x6)/(2*x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x6-x7)/(2*x5));
fprintf(a_sat,"%-24.15e",x7/(2*x5));
 fprintf(a_sat,"%-24.15e\n",ph);
endfor
endfor
```


Programa 5

Descrição: Calcula curvas de oxigenação para Hb de serpente e a respectiva distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína (inclui o processo de dissociação).

```
format long e;
Temp=293;
R=1.9872;
Nt0=3.5e-5;
Ni1=0.55;
Ni2=0.65;
Ni3=0.746;
Ni4=0.1;
Ni5=2.55:
Ni6=0;
Ni7=0;
atp=0.001;
deltaGp1=-1200.85;
deltaGp2=598.98;
deltaGp3=2530.16;
deltaGp4=-7105.46;
deltaGp5=38373;
deltaGp6=-8000;
deltaGp7=-8000;
for a=1:20
 ph=6+(a)/5;
 printf("%-24.15e\n",ph);
 deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl5=deltaGp5+R*Temp*log(atp)+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
 deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
 k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
 k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
 k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
 k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
 k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
 k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
 k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
 nome=strcat("dados_y_sem_h2o_ph_",num2str(ph),".txt");
 a_y_sem_h2o=fopen(nome,'w','native');
 nome=strcat("dados_x_sem_h2o_ph_",num2str(ph),".txt");
 a_x_sem_h2o=fopen(nome,'w','native');
 for b= 1:501
 if(ph \ge 1 \&\& ph \le 4)
   O2=(b-1)*2e-5 + 1e-15;
 elseif(ph>4 && ph<=7)
   O2=(b-1)*3e-6 + 1e-15;
 elseif(ph>7 \&\& ph<=10)
```

```
O2=(b-1)*1e-7 + 1e-15;
 elseif(ph>10 && ph<=12)
  O2=(b-1)*2e-8 + 1e-15;
 elseif(ph>12 && ph<=14)
  O2=(b-1)*1e-10 + 1e-15;
 endif
 k1=k1aux*O2:
 k2=k2aux*O2:
 k3=k2aux*O2;
 k4=k4aux*O2;
 k6=k6aux*O2:
 k7=k7aux*O2;
 Termo1=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
 Termo2=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
 Termo3=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
 x7=(-Termo2-sqrt(Termo2^2 -4*Termo1*Termo3))/(2*Termo1);
 x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
 x1 = (x4 + x4 + k4 + k2 + k3 + x4 + k2 + x4 + k2 + k3)/(k4 + k2 + k3);
 x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
 x6=(x7*k7+x7)/k7;;
 x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
 x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
 ligante(b)=O2;
  eixo_y1(a,b)=Nt0 - x1 - x5; #número de mols de T0
  eixo_y2(a,b)=x1 - x2;
                         # T1
  eixo_y3(a,b)=x2-x3;
                         # T2
                         # T3
  eixo y4(a,b)=x3 -x4;
  eixo_y5(a,b)=x4;
                         # T4
  eixo_y6(a,b)=2*x5-x6;
                         # D0
  eixo_y7(a,b)=x6-x7;
                         # D1
  eixo_y8(a,b)=x7;
                         # D2
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y1(a,b));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y2(a,b));
  fprintf(a y sem h20, \%-24.15e, eixo y3(a,b));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y4(a,b));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y5(a,b));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y6(a,b));
  fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e",eixo_y7(a,b));
```

fprintf(a_y_sem_h2o,"%-24.15e\n",eixo_y8(a,b)); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",ligante(b)); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x1); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x2); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x3); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x4); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x5); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e",x6); fprintf(a_x_sem_h2o,"%-24.15e\n",x7);

endfor endfor

Programa 6

Descrição: Calcula distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação fixa de Hb de serpente por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

global k1aux; global k2aux; global k3aux; global k4aux; global k5; global k6aux; global k7aux; global Nt0; global saturacao; format long e; fsolve_options("tolerance",1e-25); Farad=23060; Temp=293; R=1.9872; Nt0=3.5e-5; Ni1=0.55; Ni2=0.65; Ni3=0.746; Ni4=0.1; Ni5=2.55; Ni6=0; Ni7=0; atp=0.001; deltaGp1=-1200.85; deltaGp2=598.98;

```
deltaGp3=2530.16;
deltaGp4=-7105.46;
deltaGp5=38373;
deltaGp6=-8100;
deltaGp7=-8100;
a_sat=fopen("saturacao.txt",'w','native');
   function y=f(x)
      global k1aux;
      global k2aux;
      global k3aux;
      global k4aux;
      global k5;
      global k6aux;
      global k7aux;
      global Nt0;
      global saturacao;
      O2=x(1);
      k1=k1aux*O2;
      k2=k2aux*O2:
      k3=k2aux*O2;
      k4=k4aux*O2:
      k6=k6aux*O2;
      k7=k7aux*O2;
      if(O2 <= 0)
         y(1)=Inf;
      else
          a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2*k2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
         b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
         c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
         x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
          x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
         x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
         x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
         x6=(x7*k7+x7)/k7;;
         x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
         x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
         y(1)=(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0)-saturacao;
      endif
         endfunction
for i=1:101
   ph=1+(i-1)*(13)/100;
```
```
printf("%-24.15e\n",ph);
saturacao=0.5;
deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl5=deltaGp5+R*Temp*log(atp)+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
                          #deltaGl1=-5700;
                          #deltaGl2=-6300;
                          #deltaGl3=-6400:
                          #deltaGl4=-8700;
                          #deltaG15=14350;
                          #deltaGl6=-8400;
                          #deltaGl7=-8400;
k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
if(i==1)
 [O2,info]=fsolve("f",10^-6);
else
 [O2,info]=fsolve("f",O2);
endif
k1=k1aux*O2;
k2=k2aux*O2:
k3=k2aux*O2:
k4=k4aux*O2;
k6=k6aux*O2:
k7=k7aux*O2;
a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*2*2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3;
b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
x6=(x7*k7+x7)/k7;;
```

```
x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
```

x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;

fprintf(a_sat,"%-24.15e",ph); fprintf(a_sat,"%-24.15e",O2); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x1); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x2); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x3); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x4); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x5); fprintf(a_sat,"%-24.15e",x6); fprintf(a_sat,"%-24.15e\n",x7); endfor

Programa 7

Descrição: Calcula constantes de equilíbrio e distribuição de espécies para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação fixa de Hb de serpente por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

format long e; Temp=293; R=1.9872; Nt0=3.5e-5; Ni1=0.55; Ni2=0.65; Ni3=0.746; Ni4=0.1; Ni5=2.55; Ni6=0; Ni7=0; atp=0.001; deltaGp1=-1200.85; deltaGp2=598.98; deltaGp3=2530.16; deltaGp4=-7105.46; deltaGp5=38373; deltaGp6=-8100; deltaGp7=-8100;

a_k_ph=fopen("assimetria.txt",'w','native'); for a=1:101 ph=6+6*(a-1)/100; printf("%-24.15e\n",ph); deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph); deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);

```
deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl5=deltaGp5+R*Temp*log(atp)+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
O2=5e-5;
k1=k1aux*O2;
k2=k2aux*O2;
k3=k2aux*O2;
k4=k4aux*O2;
k6=k6aux*O2;
k7=k7aux*O2;
a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-
2*k4*k2*k3:
b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
x6=(x7*k7+x7)/k7;;
x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
fprintf(a k ph,"%-24.15e",ph);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k1aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k2aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k3aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k4aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k5);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k6aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",k7aux);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x1);
fprintf(a k ph,"%-24.15e",x2);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x3);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x4);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x5);
fprintf(a_k_ph,"%-24.15e",x6);
```

fprintf(a_k_ph,"%-24.15e\n",x7);

endfor

Programa 8

Descrição: Calcula curvas de diluição para uma dada faixa de pH, temperatura e concentração inicial de proteína para uma saturação determinada de Hb Humana por oxigênio (inclui o processo de dissociação).

global k1aux; global k2aux; global k3aux; global k4aux; global k5; global k6aux; global k7aux; global Nt0; global alfa; global saturacao; format long e; fsolve_options("tolerance",1e-25); Temp=293; R=1.9872; N0=1e-15; Ni1=0.55; Ni2=0.65; Ni3=0.746; Ni4=0.1; Ni5=2.55; Ni6=0; Ni7=0; atp=0.001; deltaGp1=-1200.85; deltaGp2=598.98; deltaGp3=2530.16; deltaGp4=-7105.46; deltaGp5=38373; deltaGp6=-8100; deltaGp7=-8100; a_sat=fopen("dilui_sat.txt",'w','native'); for i=1:21 ph=6+2*(i-1)/20; printf("%-24.15e\n",ph);

```
for d=1:90
   Nt0=N0*(10^(d/3));
  function y=f(x)
      global k1aux;
      global k2aux;
      global k3aux;
      global k4aux;
      global k5;
      global k6aux;
      global k7aux;
      global Nt0;
      global saturacao;
      O2=x(1);
      k1=k1aux*O2;
      k2=k2aux*O2;
      k3=k2aux*O2;
      k4=k4aux*O2;
      k6=k6aux*O2;
      k7=k7aux*O2;
      if(O2 <= 0)
         y(1)=Inf;
      else
         a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k
2*k4*k2*k3;
         b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
         c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
         x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
         x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
         x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
         x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
         x6=(x7*k7+x7)/k7;;
         x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
         x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
         y(1)=(x1+x2+x3+x4+x6+x7)/(4*Nt0)-saturacao;
      endif
         endfunction
   saturacao=0.6;
   deltaGl1=deltaGp1+Ni1*R*Temp*log(10^-ph);
   deltaGl2=deltaGp2+Ni2*R*Temp*log(10^-ph);
   deltaGl3=deltaGp3+Ni3*R*Temp*log(10^-ph);
   deltaGl4=deltaGp4+Ni4*R*Temp*log(10^-ph);
```

```
deltaGl5=deltaGp5+R*Temp*log(atp)+Ni5*R*Temp*log(10^-ph);
```

```
deltaGl6=deltaGp6+Ni6*R*Temp*log(10^-ph);
  deltaGl7=deltaGp7+Ni7*R*Temp*log(10^-ph);
  k1aux=(exp(-deltaGl1/(R*Temp)))*4;
  k2aux=(exp(-deltaGl2/(R*Temp)))*1.5;
  k3aux=(exp(-deltaGl3/(R*Temp)))*(2/3);
  k4aux=(exp(-deltaGl4/(R*Temp)))*0.25;
  k6aux=(exp(-deltaGl6/(R*Temp)))*2;
  k7aux=(exp(-deltaGl7/(R*Temp)))/2;
  k5=exp(-deltaGl5/(R*Temp));
  k1=k1aux*O2:
  k2=k2aux*O2:
  k3=k2aux*O2;
  k4=k4aux*O2;
  k6=k6aux*O2;
  k7=k7aux*O2;
  a=-2*k1*k4*k2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4^2*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2*k2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k1*k4*k2^2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3^2-2*k3
2*k4*k2*k3;
  b=(-k4*k2*k7*k3*k6*k5-k4*k2*k7*k3*k6^2*k5-k4*k2*k7^2*k3*k6^2*k5);
  c=2*k4*k2*k7^2*k3*Nt0*k6^2*k5;
  x7=(-b-sqrt(b^2 - 4*a*c))/(2*a);
  x4=-(-k1*k4*k2*x7*k3-k1*k4*k2*x7*k7*k3*k6+2*k1*k4*k2*k7*k3*Nt0*k6-
k1*k4*k2*x7*k3*k6)/(-2*k1*k7*k6-2*k7*k6-2*k1*k4*k2*k7*k3*k6-2*k1*k2*k7*k3*k6-
2*k1*k2*k7*k6);
  x1=(x4+x4*k4*k2*k3+x4*k2+x4*k2*k3)/(k4*k2*k3);
  x5=(x7*k6+x7+x7*k7*k6)/(2*k7*k6);
  x6=(x7*k7+x7)/k7;;
  x2=(x4+x4*k3+x4*k4*k3)/(k4*k3);
  x3=(0-(-x4-x4*k4))/k4;
alfa=x5/Nt0;
 fprintf(a_sat,"%-24.15e",log10(Nt0));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",alfa);
  fprintf(a sat,"%-24.15e",(Nt0-x1-x5)/(Nt0-x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x1-x2)/(Nt0-x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x2-x3)/(Nt0-x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x3-x4)/(Nt0-x5));
  fprintf(a sat,"%-24.15e",x4/(Nt0-x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",(2*x5-x6)/(2*x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",(x6-x7)/(2*x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e",x7/(2*x5));
  fprintf(a_sat,"%-24.15e\n",ph);
 endfor
endfor
```