

ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA E  
FOTOACÚSTICA APLICADOS À MOLECULA DE HEMOGLOBINA

*Niusa Aparecida Marigheto*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. José Inácio Catrim Vasconcellos*

COORIENTADORA: *Prof.ª Dr.ª Nilce Correa Meirelles*

*Este exemplar corresponde  
à redação final da tese  
defevida pelo Aluno Niusa  
Aparecida Marigheto e aprovada  
em 20/Abril/88  
Jo Zucato*

*Trabalho apresentado no Instituto  
de Física Gleb Wataghin da Unicamp  
como pré-requisito a obtenção do  
título de Mestre em Ciências.*

1988

Dedico este Trabalho

À Suprema Mente Cósmica, que me propiciou a Vida  
e a Inspiração para realizá-lo.

A Todos os Seres que ajudaram a concretizá-lo.

E a Todos os Seres que por ventura venham dele  
usufruir.

"Que Tudo se faça  
Que Tudo se realize  
De acordo com Leis e Fatos  
Que a Vida por hora  
Nos permite Tocar"

## AGRADECIMENTOS

É muito comum, em teses, lermos os agradecimentos a fulano, ciclano e beltrano por isto, aquilo, aquilo outro. Se fosse fazer isso, gastaria tantas páginas quantas são as da tese para agradecer a todos que me ajudaram.

Por isso eu gostaria de fazer um agradecimento único: sem palavras, mas de coração e emoção a todos aqueles que partilharam comigo o trabalho científico e de vida que por hora culmina nesta Tese de Mestrado. Cada um, na função que lhe coube no transcorrer do trabalho: como pai e mãe, orientadores, professores, amigos, colegas de cursos e de sala, secretárias, técnicos, desenhistas, médica homeopática, massagista, professora de ginástica; cada um partilhou comigo o melhor de si e me ajudou, de acordo com seu nível de entendimento, a não desanimar e ir adiante...

Agradeço a todos sincera e fraternalmente e rogo à vida que retribua a cada um aquilo que lhe cabe como mercimento por esta ajuda e partilha.

Não é preciso falar

Não é preciso escrever

Aquilo que vai no Coração

É só deixar fluir

Que a vida se encarrega

De conduzir ao destino certo...

E na hora certa...

# ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	1
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO II	
O SISTEMA BIOFÍSICO - A HEMOGLOBINA	4
CAPÍTULO III	
ELEMENTOS DE ESPECTROSCOPIA MOLECULAR E SUAS APLICAÇÕES À HEMOGLOBINA	32
CAPÍTULO IV	
MATERIAL E MÉTODOS	44
CAPÍTULO V	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO VI	
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	162
BIBLIOGRAFIA	165

## RESUMO

É apresentado neste trabalho um estudo comparado entre as moléculas de hemoglobina humana A, humana S e de Rana catesbeiana. Utilizamos para este estudo duas técnicas: a espectroscopia de absorção óptica (visível e infravermelho) e a espectroscopia fotoacústica (visível). Com as amostras na forma de solução aquosa foram obtidos espectros de absorção óptica no intervalo espectral de 250nm a 600nm e fotoacústicos no intervalo de 300nm a 600nm. Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho (2,5 $\mu$  a 40 $\mu$ ) foram utilizadas amostras na forma de cristais ou liofilizados prensadas num disco de KBr. Após a obtenção dos dados experimentais foi feita a deconvolução dos espectros e um ajuste computacional das linhas obtidas tentando caracterizá-las através da frequência ou comprimento de onda de absorção máxima, largura e forma. É traçado um estudo comparado entre as diferentes hemoglobinas no mesmo intervalo espectral e são lançadas bases comparativas entre os espectros fotoacústicos e de absorção óptica.

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a compreensão e o entendimento de fenômenos biológicos muitas vezes têm se realizado tendo como passo fundamental o conhecimento da estrutura (configuração) das moléculas envolvidas nestes processos. Técnicas físicas e físico-químicas (espectroscopia, análise por raios-x, cromatografia, eletroforese) têm tornado possível estes progressos da Biologia Molecular.

Uma das moléculas que tem sido objeto de observações é a molécula de hemoglobina, em particular, pela sua função como carreadora de  $O_2$ .

Estudos da hemoglobina humana têm nos revelado facetas importantes desta molécula: seqüência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, estrutura tridimensional dos diferentes derivados e que permitem formular modelos que explicam a cooperatividade. Mas, nem sempre o conhecimento de uma molécula de hemoglobina é suficiente para explicar ou deduzir suas propriedades significantes. Se faz necessário um estudo das variantes da hemoglobina dentre de uma mesma espécie e de uma espécie para outra. Mais ainda, um estudo comparado entre diferentes hemoglobinas pode nos propiciar uma perspectiva mais ampla desta molécula e de outras.

Além de uma perspectiva da própria molécula em particular, uma compreensão mais ampla da evolução da molécula no decorrer dos anos e o lançamento de bases para o entendimento de passos evolutivos importantes para todas as espécies têm sido

propiciado pelo estudo das hemoglobinas de anfíbios. Os anfíbios representam um estágio na transição da vida aquática para a vida terrestre e suas hemoglobinas ilustram a plasticidade molecular em resposta a pressões ambientais.

Com estas informações e com o fato de que, embora a espectroscopia tenha ajudado a elucidar a estrutura de moléculas como a hemoglobina uma caracterização mais detalhada do espectro desta se faz necessário, propomos este trabalho.

Realizamos um estudo comparado entre as hemoglobinas humana A, humana SS e de Rana catesbeiana. Como técnicas foram utilizadas a espectroscopia de absorção óptica e fotoacústica. Após a obtenção dos dados experimentais procedemos a deconvolução dos espectros e análise teórica das linhas obtidas. Traçamos ainda dados comparativos entre as diferentes hemoglobinas na mesma região espectral e entre os espectros de absorção óptica e fotoacústicos.

No capítulo II faremos uma breve exposição a respeito da hemoglobina, sua estrutura geral e algumas propriedades. No capítulo III, elementos de espectroscopia molecular e suas aplicações à hemoglobina são apresentados. Já no capítulo IV, o material e os métodos de obtenção dos espectros são apresentados. No capítulo seguinte (capítulo V) apresentamos os resultados e uma discussão a respeito destes. Por último (capítulo VI) traçamos algumas conclusões gerais.

## CAPÍTULO II

### O SISTEMA BIOFÍSICO: A HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma proteína respiratória, isto é, uma proteína cuja função fisiológica é a de transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e facilitar o transporte de CO<sub>2</sub> dos tecidos para os pulmões. Embora sua localização preferencial pareça ser as células sanguíneas a hemoglobina tem uma ampla distribuição filogenética (GRATZER e ALLISON, 1960; MANWELL, 1960). A hemoglobina de mamíferos é um tetrâmero de peso molecular de aproximadamente 64.500 cujas dimensões são 64x55x50 Å; é composta de quatro subunidades, cada uma com peso molecular de aproximadamente 16.000, formada por uma cadeia polipeptídica (a globina) associada a um grupo prostético denominado heme. O grupo heme é um anel protoporfirínico no centro do qual está um átomo de ferro ao qual oxigênio e outros ligantes ligam-se reversivelmente. Duas dessas subunidades são denominadas cadeias alfa(α), cada uma constituída de 141 resíduos de aminoácidos; as outras duas são denominadas cadeias beta(β), contendo cada uma 146 resíduos de aminoácidos.

#### II.1. ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA

##### II.1.1. Estrutura primária

Como todas as proteínas, o esqueleto da molécula de hemoglobina é formado por uma sequência de aminoácidos determinada geneticamente. No caso da hemoglobina humana adulta (Hb A)



esta seqüência foi determinada por BRAUNITZER et al. (BRAUNITZER et al. 1961, 1964) e KONIGSBERG et al. (KONIGSBERG et al. 1961, 1962, 1963).

### II.1.2. Estrutura secundária

Aproximadamente dois terços de cada cadeia estão dispostos em estruturas chamadas  $\alpha$ -hélice. Existem 7 ou 8 dessas nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  respectivamente, designadas de A a H e elas contêm de 7 a 20 resíduos de aminoácidos. Existem 3,6 resíduos de aminoácido por turno de hélice e as dobras são estabilizadas por pontes de hidrogênio. O um terço restante dos resíduos é distribuído em regiões não helicoidais e dobras da cadeia (WINSLOW e ANDERSON, 1978).

### II.1.3. Estrutura terciária

Embora existam diferenças na seqüência de aminoácidos das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, as cadeias polipeptídicas se organizam ao redor do grupo heme dando uma estrutura terciária semelhante. (BALDWIN, 1975) A presença do heme é uma força estabilizadora da cadeia polipeptídica. O grupo heme está situado em uma cavidade hidrofóbica formada pela cadeia polipeptídica. É mantido nesta cavidade por um grande número de interações entre o anel pirrólico e os aminoácidos da mesma. Em adição ele é ligado covalentemente à histidina F8 chamada histidina proximal. A histidina distal E7 não é ligada covalentemente ao grupo heme, mas a sua presença na cavidade onde o heme se localiza é importante para a manutenção das relações espaciais. (WINSLOW e ANDERSON, 1978).

Mas, o que determina o arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica? A característica mais notável em todas as cadeias da globina é a exclusão quase completa dos resíduos polares do interior da molécula (PERUTZ et al., 1965) sugerindo que o padrão de invariância das cadeias laterais não-polares, junto com a parte não-polar do anel porfirínico, deve ser decisivo na determinação da conformação da cadeia de globina. As razões para a localização no interior da molécula das cadeias laterais não polares são similares àquelas que explicam a insolubilidade de hidrocarbonetos em água. A presença de hidrocarbonetos ordena as moléculas de água na sua vizinhança imediata, resultando na redução da entropia do sistema. Então a exposição de uma larga e rígida cadeia não-polar leva a estrutura da proteína a uma situação de instabilidade por redução da entropia na água ao redor. Contrariamente, impedindo o contato das cadeias laterais não-polares com a água há um ganho de entropia pela estrutura nativa e dobrada da proteína e pela água ao redor em relação à sua forma desnaturada e não-dobrada (PERUTZ, 1965, 1969).

Um diagrama esquemático das estruturas secundária e terciária características da hemoglobina é mostrado na figura 1.

#### II.1.4. Estrutura Quaternária

A estrutura tridimensional tem sido estudada por métodos de cristalografia de raios x. (PERUTZ et al., 1960, 1964, 1968; CULLIS et al., 1962; MUIRHEAD e GREER, 1970; BOLTON e PERUTZ, 1970). Estes estudos revelam que as quatro subunidades estão arranjadas tetraedricamente e a estrutura é tal que os

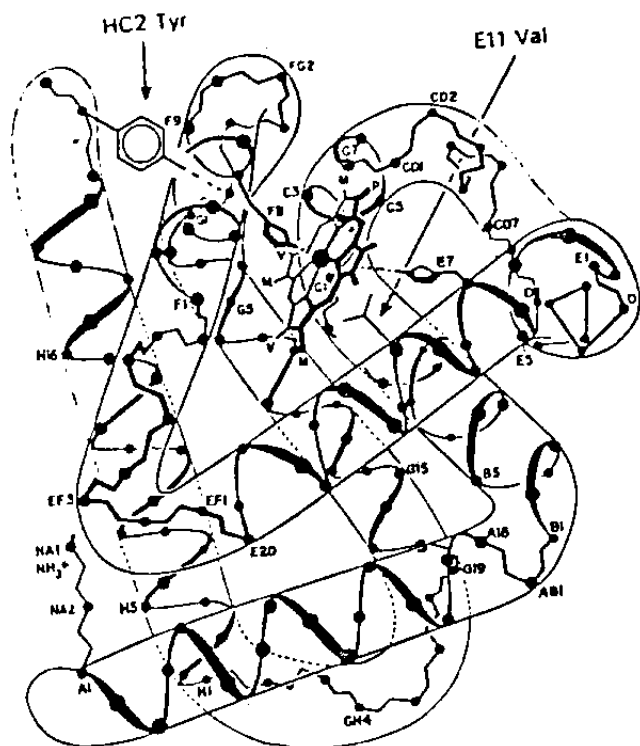


Fig. 1 - Estruturas secundária e terciária características da hemoglobina, mostrando os carbonos  $\alpha$  e a coordenação do grupo heme (PERUTZ, 1976).

quatro grupos heme, os sítios de ligação para  $O_2$  e outros ligantes estão distantes entre si: a distância entre dois átomos de ferro varia de 25 a  $37 \text{ \AA}$  (PERUTZ, 1970) e cada um deles se situa em uma cavidade não-polar na superfície da molécula (BALDWIN, 1975). O arranjo das quatro subunidades na hemoglobina tetramérica é diferente na deoxi-hemoglobina (hemoglobina não-ligada) e na hemoglobina ligada (MUIRHEAD e PERUTZ, 1963), confirmando a observação de HAURWITZ que cristais de deoxihemoglobina se dissolvem ao serem expostos ao ar e que cristais de oxihemoglobina com uma morfologia diferente precipitam na solução (HAURWITZ, 1938).

A molécula tem um eixo de simetria, cada metade contendo uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$  que são mantidas juntas por um grande número de interações atômicas. As áreas de contato entre as cadeias semelhantes ( $\alpha$  e  $\alpha$ ;  $\beta$  e  $\beta$ ) são polares, enquanto que entre as cadeias diferentes ( $\alpha$  e  $\beta$ ), são hidrofóbicas. Existem 4 áreas de contato entre as subunidades diferentes:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_1$ . Os contatos das regiões  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$  são chamados contatos de deslizamento, pois permitem movimento durante a oxigenação e deoxigenação. Já os contatos  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$  são chamados contatos de empacotamento pois apresentam o empacotamento das subunidades que não muda quando há mudança no estado de ligação do heme.

A molécula é globular com uma cavidade central. Esta cavidade é preenchida com água e permite a entrada de moléculas carregadas. A maioria dos aminoácidos das cadeias laterais com carga estão dirigidos para fora da molécula permitindo relações eletrostáticas com solventes e também a solubilidade dos eritrócitos (WINSLOW e ANDERSON, 1978).

Um esquema da estrutura quaternária é apresentado na



figura 2.

## II.2. ESTRUTURA DO GRUPO HEME

A capacidade da hemoglobina se ligar ao  $O_2$  e a outros ligantes é devida à presença do grupo prostético HEME. O grupo prostético, ligado covalentemente à proteína envolve um átomo de ferro coordenado ao anel tetrapirrólico - a protoporfirina IX (figura 3). Os nitrogênios pirrólicos constituem os quatro ligantes do átomo de ferro nas posições equatoriais (CAREY, 1982). Na hemoglobina a 5.<sup>a</sup> posição de coordenação é ocupada pelo nitrogênio imidazólico da histidina proximal F8. A sexta posição de coordenação pode ser ocupada por  $O_2$  (na oxihemoglobina);  $H_2O$ ,  $CO$ ,  $CN^-$  ou estar vazia (na deoxihemoglobina). Deste modo, o Ferro forma um complexo de coordenação com simetria octaédrica.

O Ferro pode ter dois estados de oxidação: estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ) e férrico ( $Fe^{+3}$ ). Cabe dizer aqui que a "raison d'etre" da hemoglobina é o transporte de  $O_2$  dos pulmões para os tecidos e isto requer que o  $O_2$  se ligue reversivelmente à hemoglobina- $Fe^{+2}$ . Mas, no heme livre, em presença de  $O_2$  o átomo de Ferro no estado ferroso é oxidado ao estado férrico, enquanto que na hemoglobina, o átomo de Ferro se combina reversivelmente com o  $O_2$  e permanece no estado ferroso nas formas oxigenada e deoxigenada. Esta combinação reversível com oxigênio é possível na hemoglobina pelas dobras das cadeias polipeptídicas ao redor do heme proporcionando-lhe um meio hidrofóbico (BALDWIN, 1975). As dobras das cadeias polipeptídicas na hemoglobina aparecem como sendo um padrão fundamental da natureza projetado para manter o grupo heme num meio hidrofóbico e então o átomo de Ferro

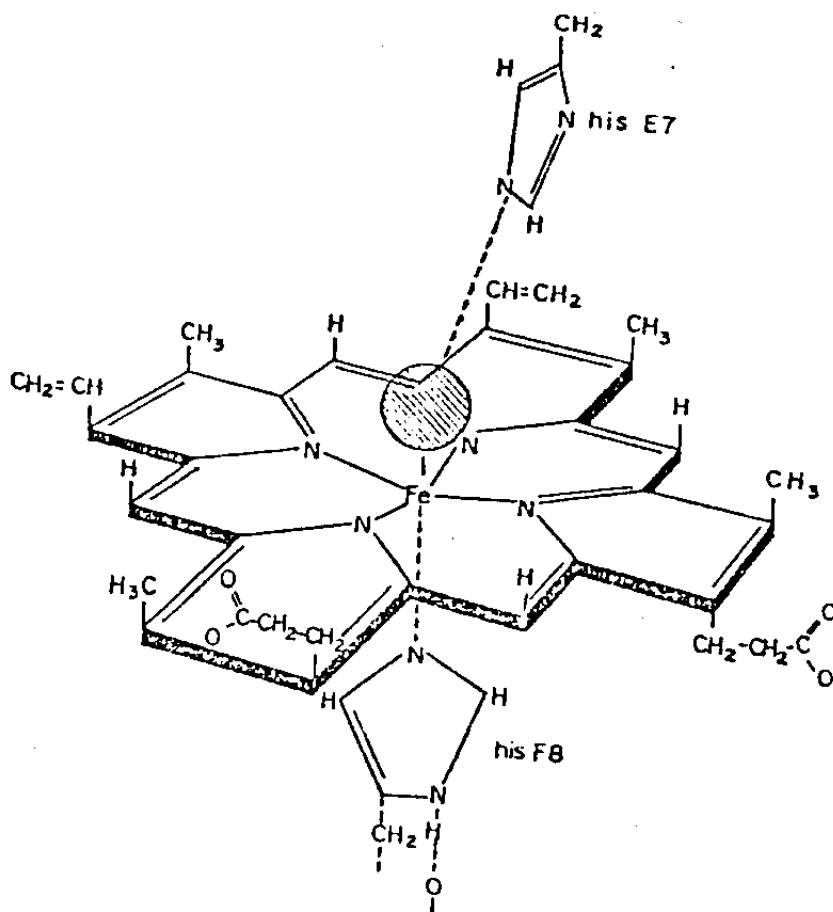
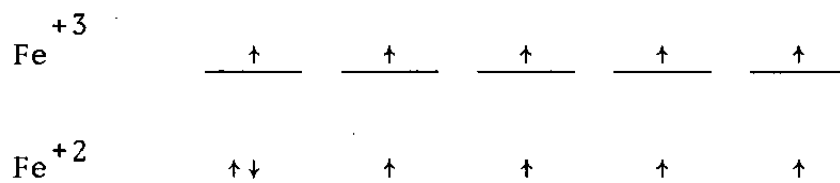


Fig. 3 - Estrutura do grupo heme, mostrando as histidinas proximal F8 e distal E7; a esfera hachurada representa a posição do 6º ligante (PERUSSI, 1983).

pode combinar-se reversivelmente com oxigênio molecular (PERUTZ, 1969). Por outro lado, a oxidação irreversível do heme, quando está isolado, se processa por um complexo intermediário em que uma molécula de oxigênio forma uma ponte entre os dois átomos de Ferro de dois hemes. Na hemoglobina as dobras das cadeias polipeptídicas impedem a formação de tais pontes pelo isolamento de cada heme em lugares separados. Além do mais, na proteína, o Ferro está ligado ao nitrogênio imidazólico da histidina F8, o qual doa carga negativa possibilitando ao Ferro formar uma ligação fraca com  $O_2$  (PERUTZ, 1978). Desta maneira, o  $O_2$  pode ligar-se reversivelmente ao Ferro sem mudar o estado de oxidação de  $Fe^{+2}$  para  $Fe^{+3}$ .

### II.3. COORDENAÇÃO DO FERRO

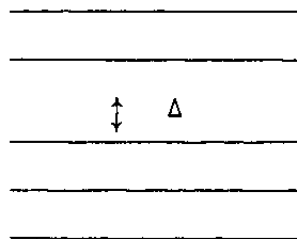
Um átomo de Ferro neutro tem 26 elétrons e pode apresentar 2 estados de oxidação: estado férrico ( $Fe^{+3}$ ) ou ferroso ( $Fe^{+2}$ ), sendo a configuração orbital  $3d^5$  e  $3d^6$  respectivamente. Existem cinco orbitais  $3d$ , e em um meio não perturbado, isto é, no átomo de Ferro livre, eles têm a mesma energia e são, portanto, degenerados. A distribuição dos elétrons nos orbitais é determinada principalmente pela energia de repulsão dos elétrons dos orbitais será:



No caso da hemoglobina e de outros compostos no contexto biológico, o átomo de Ferro está envolvido por ligantes e estes removem a degenerescência dos orbitais  $3d$ . O modo

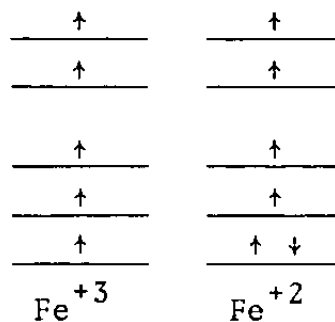


lo mais simples que descreve este efeito é o seguinte: cada ligante pode ser representado por uma carga puntiforme negativa. O conjunto de cargas puntiforme originam um campo de potencial - o campo ligante -. Tem-se, que os elétrons d estão sujeitos a duas perturbações: o efeito da repulsão eletrônica e o efeito do campo ligante (MURRELL, et al., 1978). O efeito do campo ligante com simetria octaédrica do tipo encontrado em hemes no conjunto dos orbitais d é dividí-los em dois grupos discretos de 3 orbitais com menor energia e 2 orbitais com maior energia, separados pela energia do campo ligante, convencionalmente simbolizada por  $\Delta$ . Ver figura abaixo:



A ocupação dos orbitais 3d pelos elétrons depende das magnitudes relativas da energia de separação do campo ligante ( $\Delta$ ) e da energia de repulsão eletrônica ( $E_r$ ). Quando  $\Delta$  é relativamente menor que  $E_r$ , todos os cinco orbitais 3d serão preenchidos, dando origem ao Ferro alto-spin.

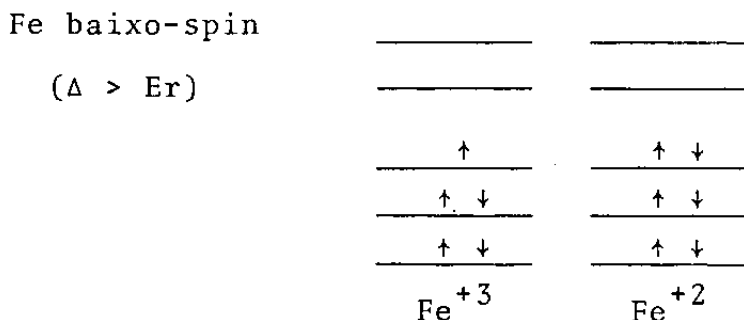
Fe alto-spin  
( $\Delta < E_r$ )



No caso de  $Fe^{+3}$  alto spin, o spin total  $S = 5/2$  e para  $Fe^{+2}$  alto spin,  $S = 2$ .

Quando a magnitude de  $\Delta$  é significativamente maior que

a Er, os elétrons 3d ocuparão os 3 orbitais de menor energia , originando Ferro baixo-spin.



De modo análogo para  $Fe^{+3}$  baixo-spin  $S = 1/2$  e para  $Fe^{+2}$  baixo-spin  $S = 0$ .

Os orbitais de maior energia estão vazios no Ferro baixo-spin e então o Ferro baixo-spin tem um raio atômico menor que Ferro alto-spin. Esta mudança no tamanho do raio com mudança no estado de spin desempenha um papel importante na geometria ferro-macrosciclo tetra pirrólico. A cavidade central do macrosciclo tem um diâmetro de  $2,02 \text{ \AA}$ ; então  $Fe^{+3}$  ou  $Fe^{+2}$  baixo-spin com aproximadamente  $1,91 \text{ \AA}$  de diâmetro pode acomodar-se dentro da cavidade e ficar no plano do macrosciclo. Em contraste,  $Fe$  alto-spin com um diâmetro aproximadamente de  $2,06 \text{ \AA}$  situa-se acima da cavidade central.  $Fe^{+3}$  e  $Fe^{+2}$  alto-spin situam-se  $0,3 \text{ \AA}$  e  $0,75 \text{ \AA}$  acima do plano macrosciclo respectivamente. (CAREY, 1982; BALDWIN, 1975).

Como já dissemos, a hemoglobina desempenha seu papel fisiológico com o átomo de Ferro no estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ). Medidas de susceptibilidade magnética (PAULING e CORYELL, 1936) demonstraram que a deoxihemoglobina ou hemoglobina não ligada tem alto-spin ( $S = 2$ ) e que a oxi-hemoglobina tem baixo-spin ( $S = 2$ ). Durante a oxigenação e deoxigenação ocorrem mudanças no estado de spin do Ferro e isto faz com que ele se mova para

dentro e para fora do plano do anel tetra pirrólico. Este movimento é transladado para a histidina F8, que se apresenta ligada ao Ferro, e é acompanhado por mudanças conformacionais na estrutura terciária e quaternária da molécula, mudanças estas importantes para a cooperatividade.

#### II.4 COOPERATIVIDADE E ALOSTERIA

A hemoglobina reage reversivelmente com oxigênio nos quatro grupos heme. Ela capta oxigênio nos pulmões, onde a tensão ( $pO_2$ ) é alta e o libera nos tecidos onde a tensão é baixa. Nos músculos o oxigênio se liga à mioglobina: uma proteína respiratória com apenas uma subunidade contendo um grupo heme. A mioglobina e a cadeia  $\beta$  da hemoglobina tem estrutura terciária semelhantes.

Ao fazermos um gráfico da fração de hemoglobina oxigenada ( $\bar{Y}$ ) ou seja, a fração de grupos heme com oxigênio ligado como função da pressão parcial de  $O_2$  ( $pO_2$ ) obtemos a curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio (figura 4a). O gráfico obtido tem a forma sigmoidal. A vantagem fisiológica da curva de equilíbrio da hemoglobina ter a forma sigmóide é percebida quando comparada com a curva correspondente para a mioglobina (figura 4b), que tem uma forma hiperbólica.

A forma hiperbólica da curva da mioglobina é aquela esperada para a combinação de uma molécula de mioglobina com uma molécula de oxigênio. A mesma forma de curva seria esperada para a hemoglobina se os quatro estágios da oxigenação ocorressem independentemente. Mas, a forma sigmóide para a curva de hemoglobina mostra que a ligação do oxigênio a um grupo heme facilita a ligação do oxigênio nos outros grupamentos heme. Em ou

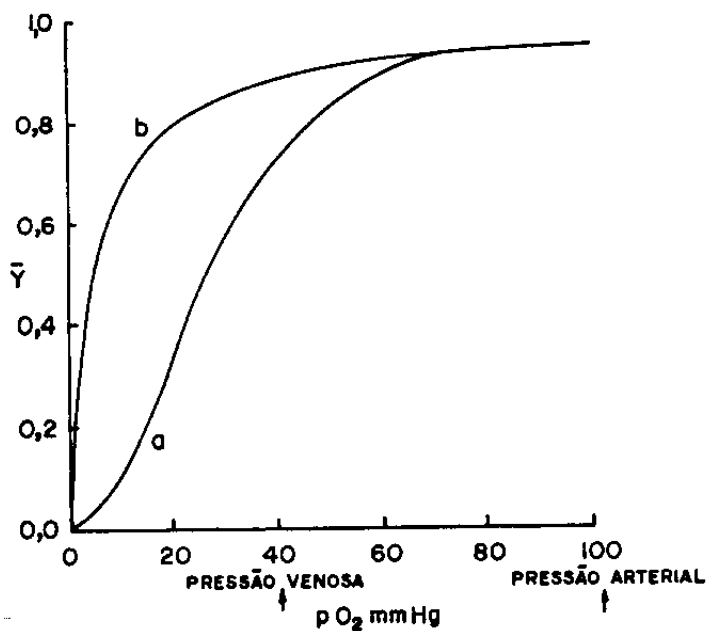


Fig. 4 - Curvas de equilíbrio com oxigênio da hemoglobina e mioglobina.  $\bar{Y}$  é a fração de grupos heme com oxigênio ligado e  $pO_2$  e a pressão parcial de oxigênio. (a) Hemoglobina, (b) mioglobina (BALDWIN, 1975).

tros termos, a união do oxigênio à hemoglobina é cooperativa.

Este fenômeno de interação cooperativa na ligação do oxigênio é conhecido como interação heme-heme. Este fenômeno não pode ser devido à interação direta entre os sítios de ligação, pois os grupamentos heme estão distantes na estrutura da hemoglobina. A interação origina-se indiretamente de mudanças conformacionais induzidas pela ligação com oxigênio que estão associadas com mudanças na estrutura quaternária entre oxi- e deoxi-hemoglobina (BALDWIN, 1975). Vê-se portanto, que a função da globina vai além de propiciar ao heme um ambiente hidrofóbico que torna possível a ligação reversível íon ferroso-oxigênio; ela capacita os quatro átomos de ferro, dentro de cada molécula, a interagir de maneira fisiologicamente vantajosa. A combinação de 3 átomos de ferro com oxigênio acelera a combinação de oxigênio com o quarto e, de modo análogo, a liberação de oxigênio por 3 átomos de ferro faz com que o quarto liberte-se de seu oxigênio mais depressa. Isso tende a fazer com que cada molécula de hemoglobina transporte quatro moléculas de oxigênio ou nenhuma, assegurando um transporte de  $O_2$  eficiente (PERUTZ, 1964).

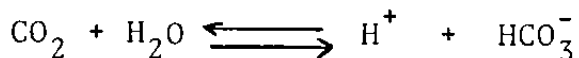
O equilíbrio da hemoglobina com oxigênio é afetado pela presença de determinados íons e moléculas: íons hidrogênio,  $CO_2$ , sais.

#### II.4.1. Íons Hidrogênio

Os íons hidrogênio se ligam tanto à oxi- quanto à deoxihemoglobina. Mas, em pH fisiológico, a deoxihemoglobina tem uma maior afinidade por estes íons do que a oxihemoglobina. Os prótons se ligam à molécula quando a oxihemoglobina perde oxigênio.

nio e são liberados quando a deoxi-hemoglobina liga-se ao oxigênio. O efeito disso é o equilíbrio entre oxigênio e hemoglobina depende da concentração de íons hidrogênio em solução, o pH. Em condições fisiológicas, uma queda do pH, reduz a afinidade pelo oxigênio e um aumento no pH, aumenta a afinidade pelo oxigênio. Mas, a interação cooperativa é fracamente alterada pela variação do pH, isto é, a forma sigmóide da curva de equilíbrio se mantém pouco inalterada. (BALDWIN, 1975). Esta interação entre a ligação com o oxigênio e os prótons, isto é, o efeito do pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é chamado de Efeito Bohr. Isto significa que a ligação do oxigênio nos sítios específicos (heme) é afetada pela ligação de prótons em outros sítios na cadeia de aminoácidos. (LIMA, 1979).

O Efeito Bohr é a chave para o transporte do dióxido de carbono. A maior parte do dióxido de carbono expelido pelos tecidos é levado aos pulmões dissolvido no sangue como ácido carbônico, que se dissocia com a formação de prótons:



Nos tecidos a concentração de oxigênio dissolvido é baixa e a de dióxido de carbono é alta. Ocorre uma queda no pH: o aumento de prótons acompanhado do dióxido de carbono dissolvido; há então uma diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Como a oxihemoglobina libera oxigênio, sua afinidade por prótons aumenta, removendo-os da solução e permitindo que mais dióxido de carbono se dissolva no sangue. Nos pulmões onde a concentração de oxigênio é alta e a de dióxido de carbono é baixa, o processo é invertido, como o oxigênio se liga à hemoglobina, os prótons são eliminados, tirando assim o dióxido de

carbono da solução que é então expelido.

#### II.4.2. Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono se liga diretamente à molécula em sítios específicos na cadeia proteica. Pode se ligar tanto à oxi- quanto à deoxi-hemoglobina, mas a deoxi-hemoglobina tem uma afinidade maior por este composto. De modo análogo à ligação de prótons, o dióxido de carbono se liga à deoxi-hemoglobina nos tecidos e é liberado quando a deoxi-hemoglobina se torna oxigenada nos pulmões. Analogamente, a afinidade pelo oxigênio é diminuída pela presença de dióxido de carbono. Esta interação direta entre hemoglobina e dióxido de carbono é responsável por 10% do transporte de dióxido de carbono.

#### II.4.3. O Efeito de Sais

Deoxihemoglobina tem uma maior afinidade por determinados sais do que oxihemoglobina. A afinidade pelo oxigênio é diminuída pelo aumento na concentração de sais. O equilíbrio com oxigênio é particularmente afetado por fosfatos orgânicos como 2,3-disfosfoglicerato, que está presente nos eritrócitos de mamíferos e inositol hexafosfato. (BALDWIN, 1975).

#### II.4.4. A Hemoglobina como Proteína Alostérica

A interação heme-heme, e as interações entre oxigênio e os quatro ligantes acima citados são conhecidos como Efeitos Cooperativos da hemoglobina. (PERUTZ, 1978).

A ligação do oxigênio a um grupo heme é afetada pela

presença de outros ligantes em outros sítios de molécula. Em outras palavras, existe uma interação entre sítios espacialmente distintos, e estas interações são chamadas interações alostéricas (do grego, allos = outro, stereo = sólido) (STRYER, 1979) . Podemos ter duas classes de interações alostéricas (WYMAN,1963): interações homotrópicas: se os sítios são da mesma natureza e ligam o mesmo tipo de ligante e interações heterotrópicas se os sítios ligam diferentes tipos de ligantes. A molécula de hemoglobina apresenta os dois tipos de interação - as interações homotrópicas representadas pelas interações heme-heme e as interações heterotrópicas pelo efeito Bohr e fosfatos orgânicos.

A interação heme-heme, que se traduz no traçado sigmóide da curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio; a elucidação da estrutura da hemoglobina, mostrando que a molécula apresenta estruturas quaternárias diferentes para oxi e deoxi-hemoglobina e que os sítios de ligação com oxigênio (grupos heme) estão distantes na molécula levaram Monod et alii em 1965 a propor um modelo para explicar a reação da molécula com o ligante. Este modelo foi chamado de Modelo Alostérico-

As subunidades da molécula de hemoglobina podem se associar originando duas estruturas quaternárias diferentes que se mantêm em equilíbrio durante todos os estágios de ligação. Estas estruturas diferem na maneira de como uma subunidade se liga à outra e isto altera a conformação das subunidades tal que uma estrutura quaternária tem maior afinidade pelo ligante do que a outra.

Estas duas formas de estrutura quaternária são chamadas de forma T (tensa) e forma R (relaxada). A forma T, a estrutura de baixa afinidade pelo ligante, é a mais estável na ausência do ligante. A forma R, a estrutura de alta afinidade pelo



ligante é a mais estável para as moléculas ligadas (na presença do ligante). A união do ligante com a proteína desvia o equilíbrio em direção a estrutura R, resultando em um aumento da afinidade pelo ligante à medida que a ligação acontece. Em ambas as estruturas a afinidade pelo oxigênio de todas as subunidades em uma molécula se mantém igual.

Uma propriedade do Modelo Alostérico é que a existência dessas duas estruturas e o deslocamento do equilíbrio entre elas na presença do ligante é que favorecem a cooperatividade (interação heme-heme). O máximo de cooperatividade é atingido quando a maioria das moléculas na estrutura T é convertida à maioria das moléculas na estrutura R, na presença do ligante (RUBIN e CHANGEUX, 1966).

O modelo alostérico proposto por Monod et alii explica o traçado sigmóide da curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio e também explica a ausência de cooperatividade quando não ocorre mudança na estrutura quaternária. A necessidade de mudança na estrutura quaternária para a cooperatividade foi demonstrada por PERUTZ em 1970. Mas, recentemente, foi demonstrado que a presença de dois tipos diferentes de estrutura quaternária não é um requisito absoluto para a cooperatividade na hemoglobina (ANTONINI, 1984).

Um simples esquema das formas R e T para a hemoglobina é mostrado na figura 5.

As bases moleculares e estruturas do modelo alostérico para a hemoglobina foram estabelecidas por PERUTZ em 1970.

A forma T é, caracterizada pela baixa afinidade pelo ligante e isto pode ser devida à posição do átomo de ferro no grupo heme. Como já foi dito anteriormente, o átomo de ferro na

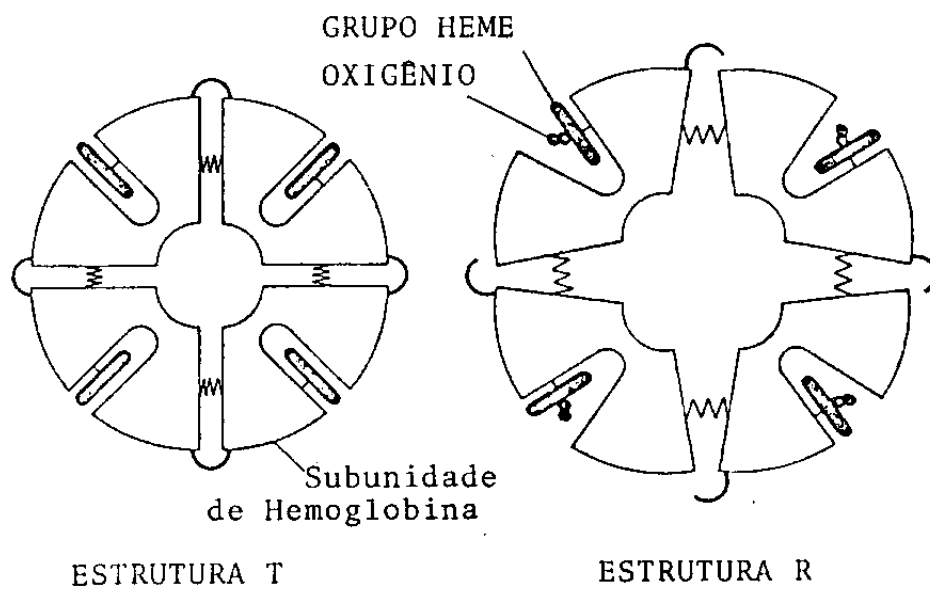


Fig. 5 - Diagrama esquemático das estruturas T e R da hemoglobina (PERUTZ, 1978).

deoxi-hemoglobina é alto - spin e se situa fora do plano do anel tetrapirrólico. A baixa afinidade também é devida ao reduzido tamanho da cavidade que aloja o grupo heme, o que dificulta a entrada do ligante. A passagem da forma T para R se dá quando a molécula recebe o ligante. A presença do ligante faz com que o ferro se mova para dentro do plano do anel, em outros termos, faz com que o ferro passe de um estado de alto-spin para baixo-spin. O movimento do ferro, provoca uma atração na histidina proximal, ao qual ele está coordenado, produzindo um movimento na subunidade. Com isso ocorre uma alteração na estrutura terciária e uma modificação nos contatos entre as cadeias induzindo uma nova estrutura quaternária. Há então uma diminuição na rigidez da molécula, ela passa da forma T para a forma R. Do ponto de vista geométrico, a transição entre as duas estruturas é um movimento de rotação do dímero  $\alpha_2\beta_2$  relativo ao dímero  $\alpha_1\beta_1$ . (BALDWIN, 1980; BALDWIN e CHOTHIA, 1979). Ver figura 6.

## II.5. A HEMOGLOBINA S

A estrutura primária de todas as proteínas, entre elas a hemoglobina, é determinada geneticamente sendo a informação transmitida de geração a geração. Mas, os genes podem sofrer mutações e como consequência podemos ter pequenas alterações (substituições de amino-ácidos) na estrutura primária que se refletirá nas estruturas secundária, terciária e quaternária e, conseqüentemente problemas relacionados com a função da proteína no organismo como um todo podem surgir. Muitas vezes, a alteração é de tal importância que uma doença pode se manifestar.

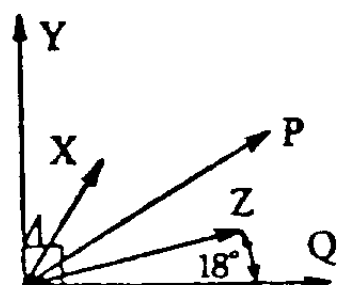
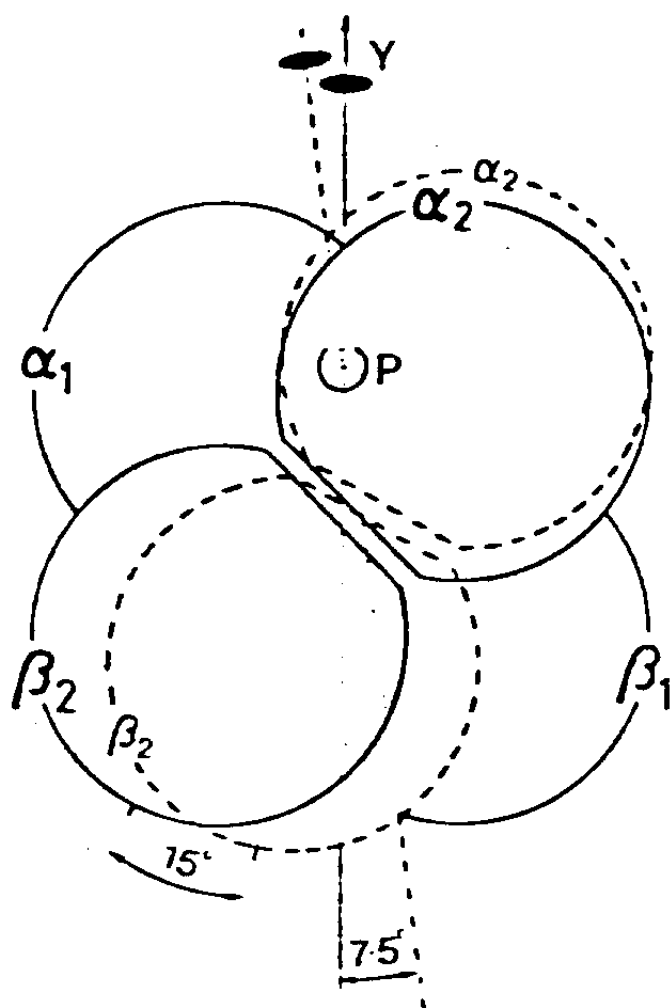


Fig. 6 - Diagrama esquemático da mudança na estrutura quaternária. Essencialmente o dímero  $\alpha_2\beta_2$  faz uma rotação de  $15^\circ$  relativa ao dímero  $\alpha_1\beta_1$ , em torno do eixo P que intersecta o eixo Y no ponto mostrado. Em adição à rotação o dímero  $\alpha_2\beta_2$  se move em direção ao papel cerca de  $0.8 \text{ \AA}$ . (BALDWIN e CHOTHIA, 1979)

Estas são as chamadas "patologias ou doenças moleculares": uma alteração a nível molecular se manifesta no organismo como uma doença.

Dentre as patologias moleculares relacionadas com a hemoglobina, as hemoglobinopatias, a mais dramática de todas é a "anemia da célula falciforme" (sickle cell anemia) em que os indivíduos apresentam não só a molécula de Hb A (normal) mas também a hemoglobina S (do inglês Sickle) no caso dos heterozigotos e somente a hemoglobina S no caso dos homozigotos, sendo que neste último as conseqüências podem ser fatais.

A patologia, que mais tarde foi chamada de anemia da célula falciforme, tem afetado africanos por séculos. As referências mais antigas datam de 1670. No começo do século um cardiologista de Chicago, James Herrick, publicou a primeira nota de "um grande número de células finas e alongadas na forma de foice ou crescente" no esfregaço de sangue de um estudante das Antilhas, notou que este problema podia estar relacionado com os corpúsculos do sangue (HERRICK, 1910). Muitos outros pesquisadores observaram que a doença era transmitida de geração a geração; que o fato de as hemácias assumirem a forma de foice ou crescente estava relacionada com a presença ou ausência de oxigênio, com a temperatura alta e baixo pH (WINSLOW e ANDERSON, 1978). Mas, foi em 1949 que Pauling mostrou que a hemoglobina de indivíduos afetados com a anemia da célula falciforme era eletroforeticamente alterada, e que as hemácias dos indivíduos com a anemia continham ambas, a hemoglobina normal e a alterada (PAULING, et al, 1949). Em 1959, Ingram localizou a diferença eletroforética e concluiu que "o amino-ácido valina substituíria o amino-ácido ácido glutâmico

na posição 6 da cadeia  $\beta$  desta hemoglobina" (notação  $\alpha_2^A \beta_2^6 \text{glu} \rightarrow \text{val}$  ).

Esta substituição produz diferenças significativas entre a Hb A e a Hb S levando a uma série de conseqüências clínicas nos portadores de tal hemoglobina. Ao ser deoxigenada a Hb S se polimeriza formando fibras, estruturas longas e tubulares (NOGUCHI e SCHECHTER, 1981) que levam à distorção das células (hemácias). Porque esta substituição leva à formação de fibras ainda é objeto de estudos (FUNG et al, 1975) mas, como esta posição está na superfície da molécula e é acessível para contatos intermoleculares, as mudanças associadas com a transição R  $\rightarrow$  T podem permitir interações específicas entre moléculas e levar à formação de fibras.

Podemos resumir o quadro da anemia falciforme como segue:

- nos capilares (tecidos) a hemoglobina S passa da forma oxi- para deoxi- com conseqüente liberação do  $O_2$ .
- polimerização da Hb S e formação de fibras.
- a hemácia assume a forma de foice ou crescente, às vezes de modo reversível, outras não.
- as células falciformes são retiradas da circulação pelo baço e fígado e isto a longo prazo causa anemia.
- as células falciformes são mais frágeis que as hemácias normais e se rompem mais facilmente podendo obstruir capilares levando à isquemias e infartos e conseqüente necrose de tecidos e órgãos e também processos inflamatórios nas articulações.

O gene S - assim chamado o gene mutante que codifica a hemoglobina S - ocorre entre africanos e negros de outros países para onde os africanos foram exportados durante a escravidão. Em alguns pontos da África até 45% da população possui o

gene S e, entre os negros americanos cerca de 8% o possuem (WINSLOW e ANDERSON, 1978).

Quanto à hemoglobina S, ainda podemos dizer que a curva de equilíbrio de oxigênio em  $\text{pH} \approx 7,14$  é idêntica à curva da hemoglobina A. (ANTONINI e BRUNORI, 1971).

## II.6. A HEMOGLOBINA DE RANA CATESBEIANA

Estudos de hemoglobinas humanas têm nos dado a sequência de amino-ácidos das várias cadeias polipeptídicas, a estrutura tridimensional dos derivados oxigenado e deoxigenado e, ainda um esquema genético para a evolução das moléculas proteicas. Temos dados suficientes para formular modelos específicos que explicam a interação cooperativa das subunidades, a regulação da função pelos efeitos alostéricos e o controle genético da síntese em estados normais e patológicos. Os variantes da hemoglobina no homem tem ajudado a definir as propriedades funcionais da hemoglobina humana bem como nos dá um sistema modelo para o estudo de desordens genéticas. Talvez um conhecimento profundo de uma molécula de hemoglobina seja suficiente para deduzir suas propriedades significantes. Talvez, mas nem sempre. Dentre as moléculas conhecidas, a hemoglobina é a que mais variações apresenta. É adaptada para suprir as necessidades de muitas espécies e a variação na estrutura (de espécie para espécie) fascina muitos pesquisadores. Algumas destas variantes tem propriedades parecidas com a hemoglobina humana e ainda ilustram facetas da função da hemoglobina que são obscuras na hemoglobina humana. Com certeza um vasto conhecimento sobre outras hemoglobinas nos dará a perspectiva que buscamos. Ainda, um estudo comparado entre diferentes hemoglobinas

pode nos dar uma visão mais ampla desta molécula e de outras moléculas.

Ao longo dos anos as hemoglobinas de anfíbios têm-se mostrado objeto de estudos para muitos pesquisadores (SULLIVAN, 1974). Hemoglobinas de anfíbios são, por sua vez, interessantes: elas ilustram a plasticidade das arquiteturas moleculares em resposta a pressões adaptativas. Os anfíbios representam um estágio na transição da vida aquática para a vida terrestre. Algumas propriedades de suas hemoglobinas podem ilustrar esta transição ajudando no estudo da taxonomia e filogenia dos anfíbios bem como lançando perspectivas para o entendimento de passos evolutivos para muitas outras espécies.

Mas, dada a extensão e complexidade do assunto, neste trabalho, faremos um breve resumo da hemoglobina da Rana catesbeiana, tentando lançar possíveis comparações desta com a hemoglobina humana.

### II.6.1. Componentes da Hemoglobina

A hemoglobina ocorre nos eritrócitos anucleados na maioria das espécies de mamíferos e ocorre em eritrócitos nucleados nos outros vertebrados. Todos os anfíbios possuem eritrócitos nucleados. Eritrócitos anucleados consomem menos oxigênio que os nucleados e são, por esta razão, carreadores de oxigênio mais eficientes, mas eles precisam ser repostos com mais frequência, isto é, sua vida útil é menor do que os eritrócitos nucleados.

Como já dissemos no início deste capítulo, a hemoglobina de mamíferos é um tetrâmero composto por 2 subunidades  $\alpha$  e 2 subunidades  $\beta$ . Esta é chamada "a componente ma



ajoritária" da hemoglobina. Hemolisados humanos podem conter uma outra componente - "a componente minoritária" - também um tetrâmero composto por 2 subunidades  $\alpha$  e 2 subunidades  $\delta$ . A cadeia  $\delta$  é muito similar à cadeia  $\beta$  na seqüência de amino-ácidos diferindo apenas em dez posições. (ANTONINI e BRUNORI, 1971).

Em outras espécies de vertebrados, anfíbios por exemplo, os hemolisados apresentam componentes múltiplos da hemoglobina e estas são encontradas em todos os indivíduos normais.

Outra informação importante que gostaríamos de enfatizar é que a hemoglobina da fase adulta do indivíduo é diferente da hemoglobina da fase larval ou fetal. No caso da espécie humana, a hemoglobina fetal apresenta uma componente majoritária que é um tetrâmero com peso molecular de 64.500 e contém 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\gamma$ . A cadeia  $\gamma$ , como as cadeias  $\beta$  e  $\delta$ , contém 146 resíduos de amino-ácidos.

Componentes múltiplos da hemoglobina aparecem nos hemolisados tanto da fase adulta como da fase larval (girino) da "rã touro" Rana catesbeiana. (AGGARWAL e RIGGS, 1969). A transição das hemoglobinas da fase larval para as da fase adulta faz parte de todo um processo de desenvolvimento conhecido como metamorfose e um estudo mais detalhado sobre esta transição pode ser encontrado nos trabalhos de Maniatis e Ingram (MANIATIS e INGRAM, 1971) e as referências contidas nestes trabalhos.

As hemoglobinas do girino e do adulto da Rana catesbeiana apresentam propriedades fisiológicas diferentes (RIGGS, 1951; HAMADA et al, 1964; TRADER e FRIEDEN, 1966). As hemoglobinas do girino são caracterizadas por uma alta afinidade por

oxigênio e ausência de Efeito Bohr. As hemoglobinas do adulto apresentam baixa afinidade por oxigênio e um grande Efeito Bohr.

Já foram isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente 4 componentes majoritárias da hemoglobina do girino (WATT e RIGGS, 1975). Estas componentes, chamadas I, II, III e IV; se dividem em 2 classes funcionais: componentes I e II apresentam maior afinidade por  $O_2$  do que as componentes III e IV. As componentes I e II são predominantes em girinos "jovens" e são substituídas pelas componentes III e IV em girinos "mais velhos". O trabalho de Watt e Riggs ainda evidencia que as 4 cadeias  $\beta$  são idênticas (únicas) e que pelo menos 3 das cadeias  $\alpha$  são únicas. Possivelmente II- $\alpha$  e III- $\alpha$  são idênticas. Em adição, evidências eletroforéticas sugerem a presença de mais 3 cadeias adicionais.

A seqüência de aminoácidos da cadeia  $\alpha$  da componente III já foi determinada (MARUYAMA et al, 1980) bem como a da cadeia  $\beta$  (WATT et al, 1980). A cadeia  $\alpha$  é composta por 141 resíduos de aminoácidos dos quais 80 (57%) são idênticos aos que correspondem as mesmas posições na cadeia  $\alpha$  humana. Quase a mesma extensão de similaridade existe em comparação com a seqüência da cadeia  $\alpha$  da "rã touro" adulto. A cadeia  $\beta$  é constituída por 146 resíduos de aminoácidos e destes 55% (81) são idênticos em comparação com a cadeia  $\beta$  humana e ainda que 50% dos resíduos são idênticos à cadeia  $\beta$  do adulto.

Quanto às componentes da hemoglobina do adulto, chamadas A, B, C, D podemos dizer que a componente A é normalmente 0,5 a 0,7% do total, a componente B varia de um mínimo de 5% ao máximo de 35% e a componente C varia de 65% a quase 100%

(AGGARWAL e RIGGS, 1969).

A seqüência dos primeiros 112 resíduos de aminoácidos da cadeia  $\beta$  da componente C foi determinada em 1974 (BALDWIN e RIGGS, 1974) e a seqüência completa (140 resíduos) foi estabelecida em 1986 (TAM, GRAY e RIGGS, 1986). Um alinhamento desta seqüência com a cadeia  $\beta$  humana mostra que os 6 primeiros resíduos do segmento  $\text{NH}_2$  - terminal da cadeia humana são ausentes na cadeia  $\beta$  da rã. Dentre os restantes, 54% são idênticos.

A cadeia  $\alpha$  da componente C também já foi parcialmente sequenciada (BALDWIN, 1971).

Cabe enfatizar aqui que, muitas dificuldades experimentais para se determinar a seqüência de aminoácidos das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das componentes da hemoglobina de Rana catesbeia na têm surgido pois as hemoglobinas se polimerizam (principalmente a componente C) (BALDWIN e RIGGS, 1974) e ainda parecem existir diferenças entre populações de girino de diferentes regiões (SULLIVAN, 1974).

## CAPÍTULO III

## ELEMENTOS DE ESPECTROSCOPIA MOLECULAR E SUAS APLICAÇÕES À HEMOGLOBINA

## III.1. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

Sabemos pelas regras da Mecânica Quântica, que a energia de uma molécula é quantizada, isto é, uma molécula pode ter apenas certos valores discretos de energia. Uma molécula pode mudar de energia pela emissão ou absorção de uma onda eletromagnética, ou por colisão. Nos casos da emissão ou da absorção essa mudança ocorre segundo certas regras de seleção. Uma onda eletromagnética absorvida ou emitida por uma molécula tem uma energia exatamente igual à diferença entre dois níveis moleculares que estejam relacionados pelas regras de seleção.

A energia de uma molécula pode ser separada em quatro partes: a primeira é a energia de translação do centro de massa da molécula; a segunda é devida ao movimento da nuvem eletrônica em torno dos núcleos; a terceira parte, corresponde ao movimento vibracional dos átomos que compõem a molécula e a quarta parte diz respeito à energia de rotação da molécula como um todo.

Uma das maneiras para se investigar moléculas (níveis de energia, estrutura, organização) seria enviar energia na forma de radiação eletromagnética para o sistema sob estudo e observar os resultados. Este é o escopo da espectroscopia óptica molecular: estudo da interação da radiação eletromagnética com moléculas. O termo espectro é usado para designar um gráfico de quantidade de radiação absorvida pela amostra como função

da frequência ou do comprimento de onda da radiação. Como a energia da molécula é quantizada, o espectro obtido é discreto, cada linha correspondendo a uma transição permitida pelas regras de seleção.

Dependendo do estudo em questão, a espectroscopia óptica utiliza radiação eletromagnética com comprimentos de onda menores do que  $1 \text{ \AA}$  (raios x e raios  $\gamma$ ) até  $10^6 \text{ \AA}$  (infravermelho longínquo) (Tabela 1). A absorção de ondas eletromagnéticas na região da ultra-violeta e visível originam transições entre estados eletrônicos da molécula. Na região do infravermelho, originam transições entre estados vibracionais e na região do infravermelho longínquo, transições nas energias rotacional e translacional. Para a emissão, o raciocínio é análogo: transições entre estados eletrônicos dão origem a ondas eletromagnéticas na região da ultra-violeta e visível; e assim por diante.

A mudança de energia  $\Delta E$ , acompanhada pela emissão ou absorção de uma onda eletromagnética de frequência  $\nu$  é dada pela relação de Bohr-Planck-Einstein:

$$\Delta E = h\nu = hc\bar{\nu}$$

onde  $h$  é a constante de Planck ( $h = 6,625 \times 10^{-27}$  erg. seg),  $c$  é velocidade da luz no vácuo ( $c = 2,998 \times 10^{10}$  cm/seg) e  $\bar{\nu}$  é o número de onda;  $\bar{\nu} = 1/\lambda$  onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação.

Entre as técnicas utilizadas pela espectroscopia óptica podemos citar:

1-) espectroscopia de absorção ou transmissão onde se mede como função do comprimento de onda (ou frequência) da radiação a quantidade de radiação absorvida ou transmitida pela amostra;

Comprimento de onda no vácuo (cm)	Outras Unidades		Radiação	Origem
$10^{-12}$	$0,01\text{\AA}$	1,24 MeV	Raios Gama	Nuclear
$10^{-11}$	$0,1\text{\AA}$		duro	transições eletrônicas
$10^{-10}$	$1,0\text{\AA}$		Raios X	em camadas internas
$10^{-9}$	$10\text{\AA}$	1 nm	mole	
$10^{-8}$	$100\text{\AA}$	10 nm		
$10^{-7}$	$1000\text{\AA}$	100 nm	ultravioleta-vácuo	
	$1700\text{\AA}$	170 nm		transições eletrônicas
			ultravioleta	em camadas externas
	$4000\text{\AA}$	400 nm	visível	
	$7000\text{\AA}$	700 nm		
$10^{-6}$	$10000\text{\AA}$	1000 nm		
	$10000\text{cm}^{-1}$	1 $\mu\text{m}$		vibrações moleculares
			Infravermelho próximo	
$10^{-5}$	$1000\text{cm}^{-1}$	10 $\mu\text{m}$		rotações
$10^{-4}$	$100\text{cm}^{-1}$	100 $\mu\text{m}$	Infravermelho longo	moleculares
$10^{-3}$	300 GHz	1mm		
$10^{-2}$	30 GHz	1 cm	microondas	spins eletrônicos
$10^{-1}$	3 GHz	10 cm		spins nucleares
1	300 MHz		VHF-radio	
10	30 MHz	10 m		
			ondas curtas	
$10^2$	3 MHz	100 m		
			ondas médias	
$10^3$	300 MHz	1 Km	ondas longas	

Tabela 1 - Espectro Eletromagnético (HOLWILL e SILVESTER, 1973)

2-) espalhamento de luz;

3-) espectroscopia de reflexão onde é analisada a luz refletida pela superfície da amostra. Nestas técnicas básicas e suas variações o importante é ressaltar que ondas eletromagnéticas constituem o feixe incidente e que os dados são obtidos detectando estas ondas eletromagnéticas após a sua interação com a matéria.

Podemos ainda ter outro tipo de espectroscopia, que embora a energia incidente seja na forma de ondas eletromagnéticas, a interação desta radiação com a amostra é estudada não através da detecção e análise dessa radiação, mas, através de uma medida direta da energia absorvida pelo material por causa da sua interação com a radiação. Está é a espectroscopia foto-acústica (ROSENCWAIG, 1978).

O efeito foto-acústico ocorre quando um gás, numa célula fechada é iluminado por uma luz interrompida periodicamente. A energia absorvida pela amostra, caso o material não degrade fotoquimicamente, é convertida inteira ou parcialmente em energia cinética (calor) das moléculas do gás. Se a radiação incidente for interrompida periodicamente utilizando-se um modulador mecânico, a absorção de energia é interrompida à mesma frequência do modulador e conseqüentemente, o calor produzido na amostra após a conversão de energia também aparece nesta frequência. Em um sistema fechado, a volume constante, a produção periódica de calor produz aumento na pressão que segue a frequência de modulação da radiação incidente (ADAMS, 1976) e estas flutuações na pressão podem então ser detectadas, como som, por um microfone sensível.

A espectroscopia foto-acústica foi desenvolvida ini

cialmente para gases, mas atualmente pode-se utilizar qualquer tipo de amostra: cristais, amorfos, gel, líquidos, sólidos, material orgânico, biológico etc. (ROSENCWAIG, 1978) e nos permite obter um espectro similar ao espectro de absorção óptico, pois somente a luz absorvida é convertida em som. (ROSENCWAIG e GERSHO, 1976)

### III.2. PARÂMETROS PARA CARACTERIZAÇÃO DE UM ESPECTRO

Dado que a energia de uma molécula é quantizada, um espectro dessa molécula, seja de absorção ou fotoacústico, será constituído por linhas ou bandas de absorção. Uma banda de absorção tem várias características ou parâmetros de grande importância para a interpretação da estrutura, da ligação e do meio circundante a uma dada molécula sob estudo:

- frequência ( $\nu$ ); número de onda ( $\bar{\nu}$ ) ou comprimento de onda ( $\lambda$ ) onde a banda atinge a máxima absorção. Usaremos a notação  $\nu_m$ ,  $\bar{\nu}_m$ ,  $\lambda_m$  para este parâmetro.
- a largura de uma banda é expressa como a largura em  $\text{cm}^{-1}$  ou  $\lambda$  à meia altura do pico máximo em absorção. A notação para este parâmetro é  $\Delta\bar{\nu}$  ou  $\Delta\lambda$ .
- a forma da linha espectral que está associada aos mecanismos de relaxação e ao mecanismo de alargamento natural (interação da molécula com o campo eletromagnético quantizado que atua como banho térmico para a mesma).
- o valor da intensidade máxima (ou pico de absorção) da linha espectral, em geral, medido em termos relativos, em unidades arbitrárias, que dá uma indicação da quantidade de radiação eletromagnética absorvida pela molécula àquela frequência.



- possíveis deslocamentos da frequência central da absorção devido a efeitos de campos elétricos e magnéticos (AC ou DC) , etc.

O estudo da forma e largura de uma linha espectral é fundamental para compreendermos os mecanismos de relaxação da molécula, sua estrutura espectral (das vibrações ou rotações ou das interações roto-vibracionais) e sua interação com o campo eletromagnético externo. A identificação dos mecanismos de relaxação (emissão espontânea, colisões, interação dipolo-dipolo , etc.) e de outros mecanismos de alargamento de linha, tais como alargamento por efeito da intensidade da radiação eletromagnética devido a uma fonte externa ou o alargamento devido ao movimento térmico das moléculas de um gás (efeito Doppler) ou a efeito de inomogeneidade da linha devido a pequenas variações de campo local (que ocorrem num sólido paramagnético, por exemplo) são outros fatores fundamentais na análise das estruturas das linhas espectrais (PANTELL e PUTHOFF, 1969; TOWNES e SCHAWLOW, 1955). Um estudo deste tipo é bastante complexo e há características que variam conforme a natureza do sistema sob estudo ou o intervalo de frequências da radiação eletromagnética que serve de ponta de prova.

### III.3. APLICAÇÕES À HEMOGLOBINA

#### III.3.1. Espectro Óptico de Absorção - visível e ultra-violeta

A espectroscopia óptica de absorção tem sido utilizada como auxiliar no estudo da estrutura e propriedades funcionais da molécula de hemoglobina.

O espectro nas regiões do visível e do ultra-violeta ajuda a estudar os estados de oxidação do ferro com diferentes ligantes bem como modificações da proteína associadas com alguma anormalidade no comportamento funcional (ANTONINI e BRUNORI, 1971). Na tabela 2 apresentamos as bandas características para algumas hemoglobinas nas regiões acima citadas. Estudos posteriores (GUPTA et al, 1984) revelam que o espectro da globina apresenta uma banda com  $\lambda_m$  em torno de 277nm com a mesma intensidade da banda  $\emptyset$  da solução de hemoglobina. E ainda que, o espectro do heme apresenta apenas uma banda com  $\lambda_m$  em 384nm com uma largura de linha comparável à da banda  $\gamma$  (Soret) da solução de hemoglobina. Os autores afirmam que o deslocamento da banda do Soret para o ultra-violeta quando o heme é separado da globina é devido ao aumento da interação heme-heme. Quando às bandas  $\alpha$  e  $\beta$  o que se observa é que elas estão relacionadas com transições eletrônicas no anel porfirínico (grupo heme) (FALK, 1964).

### III.3.2. Espectro Óptico de Absorção - infravermelho

A presença da água nos materiais biológicos restringe a medida da absorção na região do infravermelho. As medidas de materiais em soluções aquosas nesta região podem ser realizadas nas faixas de baixa absorção pela água, as chamadas "janelas" (fig. 7) (MAXWELL e CAUGHEY, 1978). Uma dessas "janelas" no infravermelho é a região de 1750 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  e nesta região foram realizados espectros com a molécula de hemoglobina coordenada a diferentes ligantes, primeiramente CO (WANG et al, 1958; ALBEN e CAUGHEY, 1968) e depois  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{CNO}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ ,

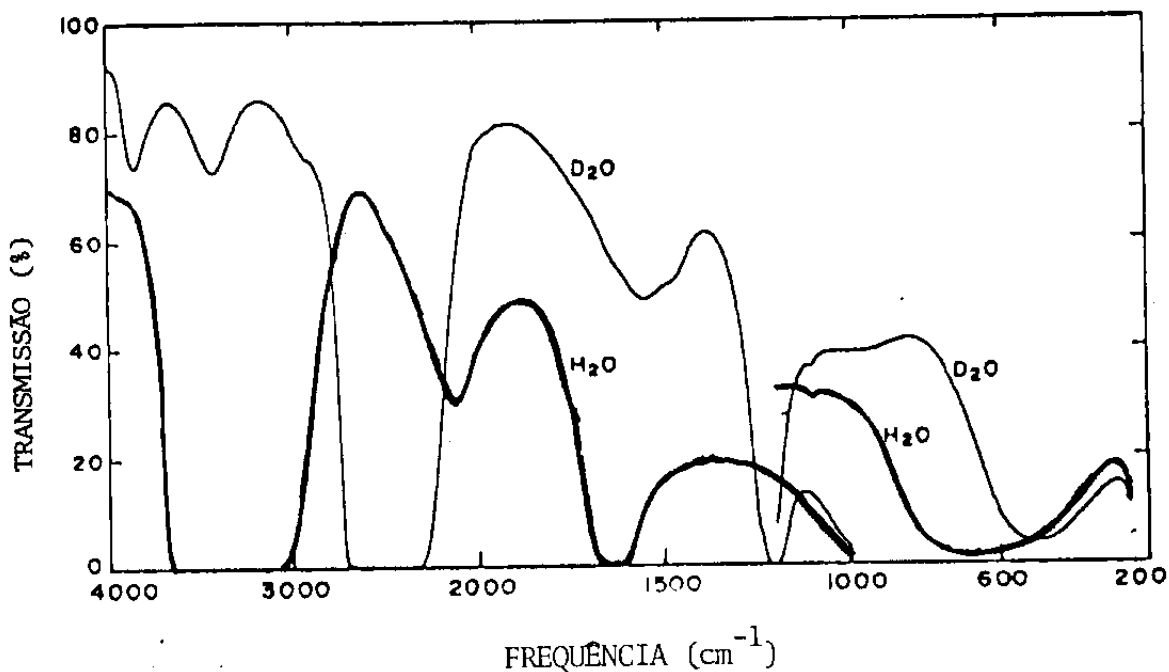


Figura 7 - Espectro infravermelho diferencial de H<sub>2</sub>O vs ar (contorno forte) e D<sub>2</sub>O vs ar (contorno fraco). Uma célula com paredes de Ca F<sub>2</sub> foi usada para obter o espectro na região de 4000 - 1000 cm<sup>-1</sup>; Ca F<sub>2</sub> absorve fortemente a partir de 1200 cm<sup>-1</sup> e não é útil abaixo 1000 cm<sup>-1</sup>. Uma célula com paredes de KRS-5 foi usada para obter o espectro na região de 1200 - 250cm<sup>-1</sup>. (MAXWELL e CAUGHEY, 1978).

	visível			Soret		ultra-violeta	
	banda-β	banda-α	banda-γ	banda-γ	banda-γ'	banda-φ	banda-φ
HbA <sup>a</sup>		555		430		274	
HbA-O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	541	577		415	344	276	
HbA-CO <sup>a</sup>	540	569		419	344		
HbA-NO <sup>a</sup>	545	575					
Hb-(Rana-adulto) <sup>b</sup>		555		429			
Hb-(Rana-girino) <sup>b</sup>		555		429			
Hb-O <sub>2</sub> (Rana-adulto) <sup>b</sup>	541	577		412			
Hb-O <sub>2</sub> (Rana-girino) <sup>b</sup>	541	577		412			"ombro" em 290

Tabela 2 - Posições dos λm (em nm) das bandas no espectro de absorção óptica nas regiões do visível e do ultra-

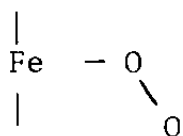
violeta para algumas hemoglobinas.

a) ANTONINI e BRUNORI, 1971

b) HAMADA et al, 1964

CNS $\bar{e}$  (Mc COY e CAUGHEY, 1970) e N<sub>2</sub>O (CAUGHEY et al, 1977). A conclusão mais importante desses estudos é que a vizinhança do grupamento heme - o sítio de ligação - é composto por grupos não-polares sendo altamente hidrofóbico, "ordenado".

Outra região, também explorada é a de 1000 a 1750 cm<sup>-1</sup>. Embora esta não seja uma "janela" para a água, superou-se esta dificuldade utilizando-se D<sub>2</sub>O como meio dispersante e fazendo uso da espectroscopia diferencial: utiliza-se um espectrômetro de duplo feixe e as amostras tanto da célula-amostra quanto da célula-referência são semelhantes diferindo apenas na molécula cuja banda deseja-se estudar. Um dos ligantes de maior interesse cuja banda característica aparece nesta região é o O<sub>2</sub> (O-O). Para o O<sub>2</sub> no estado gasoso a frequência de absorção é em 1555 cm<sup>-1</sup> (NAKAMOTO, 1962). A caracterização da banda do O<sub>2</sub> ligado à hemoglobina foi feita em 1973 por BARLOW et al. Este trabalho revelou uma banda em 1107 cm<sup>-1</sup> atribuída à frequência de estiramento da ligação O-O para O<sub>2</sub> unido à hemoglobina (BARLOW et al, 1973). Outras informações importantes que este trabalho nos deu: (i) que o O<sub>2</sub> se liga ao ferro de forma caracteristicamente "não linear".



o que confirma a idéia da interação da histidina distal com o ligante e (ii) que a ligação Fe-O<sub>2</sub> seja do tipo polar com transferência de carga.

Outro ligante cuja banda está nesta faixa do espectro, em 1615 cm<sup>-1</sup>, é o NO (MAXWELL e CAUGHEY, 1976).

### III.3.3. Espectro Fotoacústico

De modo análogo, a espectroscopia foto-acústica, tem dado sua contribuição no estudo de materiais biológicos e em particular à hemoglobina mostrando que o espectro fotoacústico da hemoglobina humana A é similar ao espectro de absorção óptica na região do visível (ROSENCWAIG, 1978). Com esta informação, o estudo de outras moléculas, cujo espectro de absorção óptico seja inviável, se torna possível através da espectroscopia fotoacústica.

Com esta técnica, foram realizados estudos comparados com as hemoglobinas humanas e de cavalo em solução e no estado cristalino (ALTER, 1983) sugerindo que pequenas mudanças funcionais na região do heme ocorrem durante a cristalização. Com a hemoglobina bovina foi realizado um estudo semelhante (ALTER, 1983) no qual se usou a hemoglobina em diferentes estados (fases): solução, cristais, liofilizada e precipitada com sulfato de amônio e este trabalho mostra também que pequenas diferenças na região do heme surgem durante o processo de liofilização e cristalização da hemoglobina.

### III.4. NOSSA PROPOSTA

Como exposto até agora, não temos dados na literatura a respeito da forma, largura e mecanismos que moldam essas formas e larguras espectrais para a molécula de hemoglobina. O presente trabalho se propõe a apresentar uma caracterização das bandas e linhas do espectro de absorção óptica das hemoglobinas humana A, humana S e de Rana Catesbeiana nas regiões do ultra-violeta próximo e visível: 250nm a 700nm e do infraver

melho  $2,5\mu$  ( $4000\text{cm}^{-1}$ ) a  $40\mu$  ( $300\text{cm}^{-1}$ ) e do espectro fotoacústico na região do visível (300 - 700nm). Tentamos caracterizar estas linhas através da frequência (ou número de onda) ou comprimento de onda, largura e forma destas linhas. Traçamos ainda: i) um estudo comparado entre as diferentes hemoglobinas nas regiões estudadas e ii) estudo comparativo entre o espectro de absorção óptica e fotoacústico. Mas foge ao escopo do presente trabalho, uma análise completa dos mecanismos de formação dessas linhas.

## CAPÍTULO IV

## MATERIAL E MÉTODOS

## IV.1. HEMOGLOBINA HUMANA A

O sangue era colhido da veia inferior do braço de indivíduos normais (portadores de hemoglobina A) na presença de heparina sódica (anticoagulante). Procedia-se a centrifugação a 16000 rpm (Sorval SS34) por 5 minutos a 4° C a fim de separar o soro e as células brancas. A seguir as hemácias eram suspensas em solução salina fisiológica (NaCl 1% e EDTA 10<sup>-3</sup>M) e lavava-se por centrifugação a 5000 rpm por três vezes. A hemólise era então obtida adicionando-se água destilada às hemácias mantendo-se uma proporção de volume a volume com relação ao volume inicial de sangue. O hemolisado era separado por centrifugação a 10000 rpm quando o sedimento era constituído por detritos celulares e membranas. Preparo de amostras isentas de cofatores: as amostras eram obtidas pela passagem por uma coluna de Sephadex G de 1.5 x 15 cm, montada em água bi destilada, e pela passagem sucessiva em colunas trocadoras de íons. Estas colunas de troca iônica eram Dowex 1-Xg (H<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), Dowex 50 W (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e mistura de Amberlite TRC-50 (H<sup>+</sup>) e IR-4B (OH<sup>-</sup>). As amostras assim preparadas encontravam-se na forma de oxihemoglobina a uma concentração de aproximadamente 10<sup>-4</sup> M.

## IV.2. HEMOGLOBINA HUMANA S

O sangue era colhido da veia inferior do braço de indivíduos portadores de hemoglobina S (pacientes do ambula



tório de Genética Médica do Hospital das Clínicas - UNICAMP) na presença de anticoagulante (solução de ácido cítrico dextrose). Procedia-se a centrifugação a 16000 rpm (Sorval SS34) por 5 minutos a 4° C a fim de separar o soro e células brancas. A seguir as hemácias eram suspensas em solução salina fisiológica (NaCl 1% e EDTA 10<sup>-4</sup>M) e lavava-se por centrifugação a 5000 rpm por três vezes. A hemólise era então obtida adicionando-se água destilada às hemácias mantendo-se uma proporção de volume a volume com relação ao volume inicial de sangue. O hemolisado era separado por centrifugação a 10000 rpm quando o sedimento era constituído por detritos celulares e membranas. Ao hemolisado (0,3 ml da solução de hemoglobina) adiciona-se 5,7 ml da solução de Drabkins. As amostras assim preparadas encontravam-se na forma de cianometahemoglobina a uma concentração de aproximadamente 10<sup>-4</sup> M.

#### IV.3. HEMOGLOBINA DE RANA CATESBEIANA

Animais adultos com peso variado entre 100 e 250 gramas, eram heparinizados por meio de injeção de 0,5 ml de heparina (2 mg/ml) 15 minutos antes de anestesiá-los no gelo. Posteriormente, os animais eram sangrados por via "conus arteriosus", recebendo-se o sangue em seringas previamente heparizadas e transferindo-se para tubos de polietileno contendo uma solução de NaCl 0,9% e EDTA 10<sup>-4</sup> M. O material era então centrifugado em centrífuga Eppendorf durante 10 minutos; o sobrenadante era desprezado e repetia-se a centrifugação por duas vezes lavando-se o precipitado com a mesma solução de NaCl/EDTA. Finalmente, o precipitado era ressuspensão em água destilada a fim de se proceder a hemólise, mantido sob agitação a 4°C du

rante uma hora. Posteriormente, procedia-se uma centrifugação em centrífuga Sorval refrigerada, a 20000 g durante 20 minutos. Ao sobrenadante límpido (hemolisado) era adicionado NaCl 0,1% a fim de se evitar possível gelificação do material e EDTA  $10^{-4}$  M como fator protetor de auto-oxidação. As amostras assim preparadas encontravam-se na forma de oxihemoglobina a uma concentração de  $10^{-4}$  M.

#### IV.4. EXPERIMENTAL

Com as amostras em solução foram obtidos os seguintes espectros: absorção linear (ultravioleta e visível) e fotoacústico (visível).

Para estendermos o estudo para a região do infravermelho foi necessária a utilização das amostras de hemoglobina na forma de cristais (hemoglobina A - Sigma) ou liofilizada (hemoglobina S e de Rana catesbeiana) dispersas num disco com paredes de KBr.

Com esta técnica obtivemos os espectros de absorção linear na região de  $25000 \text{ \AA}^0$  ( $4000 \text{ cm}^{-1}$ ) até  $400000 \text{ \AA}^0$  ( $300 \text{ cm}^{-1}$ ); como também na região do ultravioleta e do visível sendo estes últimos para efeito comparativo com os espectros obtidos com as amostras na forma de solução aquosa.

O espectrofotômetro utilizado na obtenção dos espectros de absorção linear no ultravioleta e visível foi um CARY-MODELO 17D, no infravermelho um PERKIN ELMER-MODELO 180. Para a espectroscopia fotoacústica utilizamos o aparato experimental descrito na literatura (ROSENCWAIG, 1980).

## CAPÍTULO V

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção dos resultados experimentais (espectros), passamos então à análise e caracterização das linhas espectrais. Em primeiro lugar, realizamos uma deconvolução dos espectros obtidos. Uma vez concluída esta deconvolução, procuramos fazer um ajuste computacional de cada uma das linhas tomadas individualmente utilizando as formas Lorentziana e Gaussiana como modelos básicos, determinando a frequência centro da linha, a largura da linha à meia altura e a forma da linha.

A linha Gaussiana tem a forma geral (PANTELL e PUTHOFF, 1964):

$$f_g(x) = A_g \exp(-\alpha_g x^2)$$

e  $x = \bar{\nu} - \bar{\nu}_0$  na região do infravermelho

$x = \lambda - \lambda_0$  na região do visível

$\bar{\nu}_0$  e  $\lambda_0$  são o número de onda e comprimento de onda centros da linha (máxima absorção).

sendo a largura da linha dada por:

$$\Delta \bar{\nu} = 2x = 2 (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)$$

$$\Delta \lambda = 2x = 2 (\lambda - \lambda_0)$$

Temos que:

$$fg(x) = \frac{fg(x=0)}{2}$$

$$Ag \exp(-\alpha g x^2) = \frac{Ag}{2}$$

$$\exp(-\alpha g x^2) = \frac{1}{2}$$

$$\alpha g x^2 = \ln 2$$

$$\alpha g = \frac{\ln 2}{x^2}$$

$$\alpha g = \frac{4 \ln 2}{(\Delta \bar{\nu})^2}$$

e

$$\alpha g = \frac{4 \ln 2}{(\Delta \lambda)^2}$$

onde  $\Delta \bar{\nu}$  e  $\Delta \lambda$  são dados experimentais, obtidos diretamente do espectro.

Normalizando a Gaussiana:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} Ag \exp(-\alpha g x^2) dx = 1$$

$$Ag \int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-\alpha g x^2) dx = Ag \sqrt{\frac{\pi}{\alpha g}} = 1$$

$$A_g = \sqrt{\frac{\alpha g}{H}}$$

A linha Lorentziana tem a forma geral (PANTELL e PU  
THOFF, 1969):

$$f_l(x) = \frac{A_l}{\alpha l^2 + x^2}$$

onde:  $x = \bar{\nu} - \bar{\nu}_0$  na região do infravermelho

$x = \lambda - \lambda_0$  na região do visível

$\bar{\nu}_0$  e  $\lambda_0$ : número de onda e comprimento de onda cen-  
tros da linha.

sendo a largura da linha dada por:

$$\Delta \bar{\nu} = 2x = 2 (\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)$$

$$\Delta \lambda = 2x = 2 (\lambda - \lambda_0)$$

Agora:

$$f_l(x) = \frac{f_l(x=0)}{2}$$

$$\frac{A_l}{\alpha l^2 + x^2} = \frac{A_l}{2\alpha l^2}$$

$$\alpha l^2 + x^2 - 2\alpha l^2 = 0$$

$$x^2 = \alpha l^2$$

$$x = \alpha l$$

$$\alpha_{\ell} = \frac{\Delta \bar{\nu}}{2}$$

e

$$\alpha_{\ell} = \frac{\Delta \lambda}{2}$$

onde  $\Delta \bar{\nu}$  e  $\Delta \lambda$  são obtidos diretamente do espectro.

Normalizando a curva encontramos o valor de  $A_{\ell}$  :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} f_{\ell}(x) dx = 1$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{A_{\ell}}{\alpha_{\ell}^2 + x^2} dx = \frac{A_{\ell}}{\alpha_{\ell}} \pi = 1$$

$$A_{\ell} = \frac{\alpha_{\ell}}{\pi}$$

Após o cálculo dos parâmetros ( $A_{\ell}$  e  $\alpha_{\ell}$ ) obtivemos os valores de  $f_{\ell}(x)$  e  $f_{\ell}(x)$  para diferentes valores de  $x$  para cada linha obtida, comparando com o valor experimental ( $f_e$ ).

Quanto à intensidade das linhas espectrais, foi feito um cálculo relativo, tomando-se como referência a linha cuja "absorção" foi máxima em relação às outras no mesmo intervalo espectral.

Os resultados são apresentados a seguir:

V.1. ESPECTROS DE ABSORÇÃO ÓPTICA - VISÍVEL E ULTRA-VIOLETA  
PRÓXIMO (Amostra: em Solução Aquosa)

V.1.1. Hemoglobina Humana A

As linhas obtidas foram em  $\lambda = 275\text{nm}; 345\text{nm}; 418\text{nm};$   
 $540\text{nm}$  e  $576\text{nm}$ .

$$\lambda_0 = 275\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 42,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,55 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,22 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 21,15\text{nm}$$

$$A_\ell = 6,73\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 27,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	106,7	101,0	105,0
23,5	56,1	59,0	54,0
35,3	19,2	34,8	20,0
47,0	4,3	22,2	8,0
58,8	0,6	15,1	2,0
70,5	-	10,9	-

Obs.:

U.A. = unidades arbitrárias

U.R. = unidades relativas



$$\lambda_0 = 345 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 75,3 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 4,89 \times 10^{-4} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,25 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 37,65 \text{ nm}$$

$$A_l = 11,9 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 19,8$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
23,5	72,5	68,4	68,0
47,0	32,2	37,1	37,0
70,5	8,3	21,1	20,0
94,1	1,2	13,1	13,0
117,6	0,1	8,8	9,0
141,1	-	6,3	6,0
164,7	-	4,7	4,0
188,2	-	3,6	3,0
211,7	-	2,9	2,0
235,3	-	2,3	~ 2,0
282,3	-	1,6	1,0
353	-	1,0	-

$$\lambda_0 = 418\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 27,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 3,78 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,47 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 13,5\text{nm}$$

$$A_\ell = 4,29$$

$$I \text{ (U.R.)} = 77,3$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
23,5	46,0	92,0	92,0
47,0	-	28,2	28,5
70,5	-	13,1	13,0
94,1	-	7,5	7,5
117,6	-	4,8	5,0
141,1	-	3,3	3,0
153,0	-	2,8	3,0
164,7	-	2,4	2,5
188,2	-	1,8	2,0
211,7	-	1,5	1,5
235,3	-	1,2	1,0
258,8	-	1,0	1,0
282,3	-	0,8	0,8
353	-	0,5	0,5

$$\lambda_0 = 540\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 28,2\text{nm}$$

$$\alpha_g = 3,48 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,30 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 14,1\text{nm}$$

$$A_l = 4,48\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 7,7$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
7,0	31,2	29,6	31,5
14,1	18,5	18,5	18,5
21,1	7,8	11,4	8,0
28,2	2,3	7,4	3,5
35,3	0,4	5,0	1,0
42,3	-	3,7	-

$$\lambda_0 = 576 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 21,1 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 6,22 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 4,45 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 10,55 \text{ nm}$$

$$A_l = 3,35$$

$$I(\text{U.R.}) = 8,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	16,6	17,5	14,0
23,5	1,2	6,5	5,0
47,0	-	1,8	1,3
70,5	-	0,8	0,5
94,1	-	0,4	0,3
117,6	-	0,3	0,2
141,1	-	0,2	0,1

### V.1.2. Hemoglobina Humana S

As linhas obtidas foram em  $\lambda_o = 275\text{nm}; 358\text{nm}; 420\text{nm};$   
540nm e 574nm.

$$\lambda_0 = 275 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 42,3 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 1,54 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$\alpha_\lambda = 2,22 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 21,15 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 6,73 \text{ nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 28,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	109,3	103,3	110,0
23,5	57,6	60,4	60,0
35,3	19,8	35,6	31,0
47,0	4,5	22,7	21,0
58,8	0,6	15,4	12,0
70,5	-	11,2	6,0
94,1	-	6,5	< 0,5

$$\lambda_0 = 358\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 47,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,25 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,99 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 23,5\text{nm}$$

$$A_\lambda = 7.48\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 23,3$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
23,5	56,1	56,0	60,0
47,0	7,0	22,4	23,0
70,5	0,2	11,2	11,0
94,1	-	6,5	6,5
117,6	-	4,3	4,0
141,1	-	3,0	3,0
164,7	-	2,2	2,0
188,2	-	1,7	1,5
211,7	-	1,3	1,0
282,3	-	0,7	0,5
352,9	-	0,4	-

$$\lambda_0 = 420\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 30,6\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,96 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,07 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 15,3\text{nm}$$

$$A_\lambda = 4,87\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 100$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
23,5	93,6	142,8	134,0
47,0	0,6	46,0	46,0
70,5	-	21,5	21,5
94,1	-	12,3	12,5
117,6	-	8,0	8,0
141,1	-	5,5	5,5
164,7	-	4,1	4,0
188,2	-	3,1	3,0
211,7	-	2,5	2,0
282,3	-	1,4	< 0,5
352,9	-	0,8	-



$$\lambda_o = 540\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 42,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,54 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,22 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 21,15\text{nm}$$

$$A_\lambda = 6,73\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 8,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	33,2	31,4	37,0
23,5	17,5	18,3	21,0
35,3	6,0	10,8	13,0
47,0	1,4	6,9	9,0
58,8	0,1	4,7	5,0
70,5	-	3,4	3,0
94,1	-	1,9	2,0
117,6	-	1,3	1,0
141,1	-	0,9	-

$$\lambda_0 = 574 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 37,6 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 1,95 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$\alpha_g = 2,49 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 18,8 \text{ nm}$$

$$\alpha_l = 5,98 \text{ nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 3,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
7,0	15,4	14,9	16,0
14,1	11,5	10,8	12,0
21,1	7,1	7,5	8,0
28,2	3,6	5,2	4,0
42,3	0,5	2,8	1,5
47,0	0,2	2,3	1,0
58,8	-	1,5	-
82,3	-	0,8	-

### V.1.3. Hemoglobina de Rana Catesbeiana

As linhas obtidas foram: 275nm; 350,5nm; 412nm;540nm e 576nm.

$$\lambda_o = 275\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 47,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,25 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,00 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 23,5\text{nm}$$

$$A_\lambda = 7,48\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 22,9$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	92,7	88,1	88,0
23,5	55,1	55,0	55,0
35,3	23,1	33,7	33,5
58,8	1,4	15,1	15,0
82,3	-	8,3	8,5
94,1	-	6,4	6,5
117,6	-	4,2	4,0
141,1	-	2,9	3,0
164,7	-	2,2	2,0
188,2	-	1,6	1,5
211,7	-	1,3	1,0
282,3	-	0,7	1,0
352,9	-	0,4	< 0,5

$$\lambda_0 = 350,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 70,6\text{nm}$$

$$\alpha_g = 5,56 \times 10^{-4} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,33 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_L = 35,3\text{nm}$$

$$A_L = 11,23\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 10,4$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	46,4	45,0	46,4
35,3	25,0	25,0	25,0
47,0	14,6	18,0	7,0
58,8	7,3	13,3	1,5
70,5	3,1	10,0	-
82,3	1,1	7,7	-
94,1	0,3	6,2	-

$$\lambda_0 = 412\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 35,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,22 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 26,6 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 17,65\text{nm}$$

$$A_\ell = 5,62\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 63,7$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
23,5	110,4	104,6	95
47,0	-	37,8	32
70,5	-	18,0	18
94,1	-	10,4	10,0
117,6	-	6,7	6,5
141,1	-	4,7	4,5
164,7	-	3,4	3,0
188,2	-	2,6	2,5
211,7	-	2,1	2,0
235,3	-	1,7	1,0
282,3	-	1,1	-
352,9	-	0,7	-

$$\lambda_o = 540\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 32,9\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,55 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,85 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 16,45\text{nm}$$

$$A_\lambda = 5,23\text{nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 5,2$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
7,0	22,0	21,2	22,0
14,1	15,0	14,4	16,0
21,1	8,0	9,4	9,0
28,2	3,3	6,3	3,5
35,3	1,0	4,4	1,0
42,3	0,3	3,2	< 0,5

$$\lambda_0 = 576 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 18,8 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 7,82 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 5,00 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 9,4 \text{ nm}$$

$$A_l = 2,99 \text{ nm}$$

$$I(\text{U.R.}) = 5,2$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
11,7	8,6	9,8	9,5
23,5	0,3	3,4	3,5
35,3	-	1,6	1,5
47,0	-	0,9	1,0
58,8	-	0,6	0,5
70,5	-	0,4	< 0,5
82,3	-	0,3	-



Nas figuras 8, 9 e 10 apresentamos os espectros da Hemoglobina Humana A, Humana S e de Rana Catesbeiana respectivamente, bem como as respectivas curvas teóricas.

Estes resultados nos mostram que:

- i) quanto ao comprimento de onda de absorção máxima: os dados obtidos concordam com dados citados na literatura conforme exposto na tabela 2 do capítulo IV. E ainda que, embora existam desvios para uma mesma linha nas diferentes amostras, estes provavelmente refletem diferenças estruturais nas hemoglobinas, como exposto no capítulo II.
- ii) quanto à largura das linhas espectrais: para algumas linhas nas diferentes amostras as larguras são comparáveis variando muito pouco: por exemplo a linha em  $\lambda_0 = 275\text{nm}$  varia de 42,3nm a 47,0nm. Já a linha com  $\lambda_0$  ao redor de 350nm varia de 47,0nm a 75,3nm.
- iii) quanto à forma: algumas linhas se aproximam muito de uma Lorentziana, por exemplo a linha com  $\lambda_0$  ao redor de 415nm em todas as amostras. Já a linha com  $\lambda_0 = 275\text{nm}$ : para a Hb A ela se aproxima de uma Gaussiana e para a Hb de Rana Catesbeiana ela se apresenta como uma Lorentziana.

Um quadro comparativo desses resultados é dado na tabela 3.

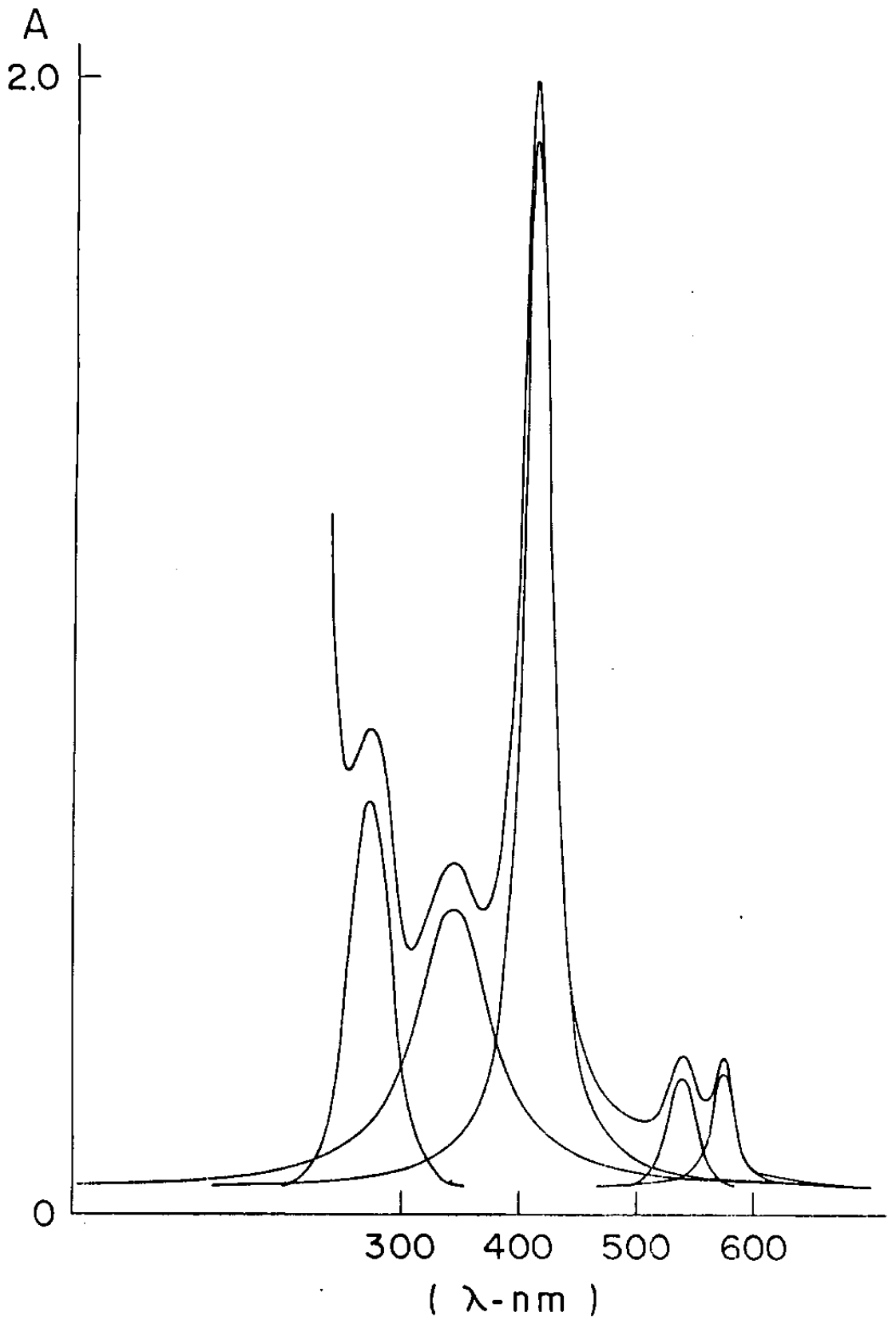


Figura 8 - Espectro de absorção óptica hemoglobina humana A

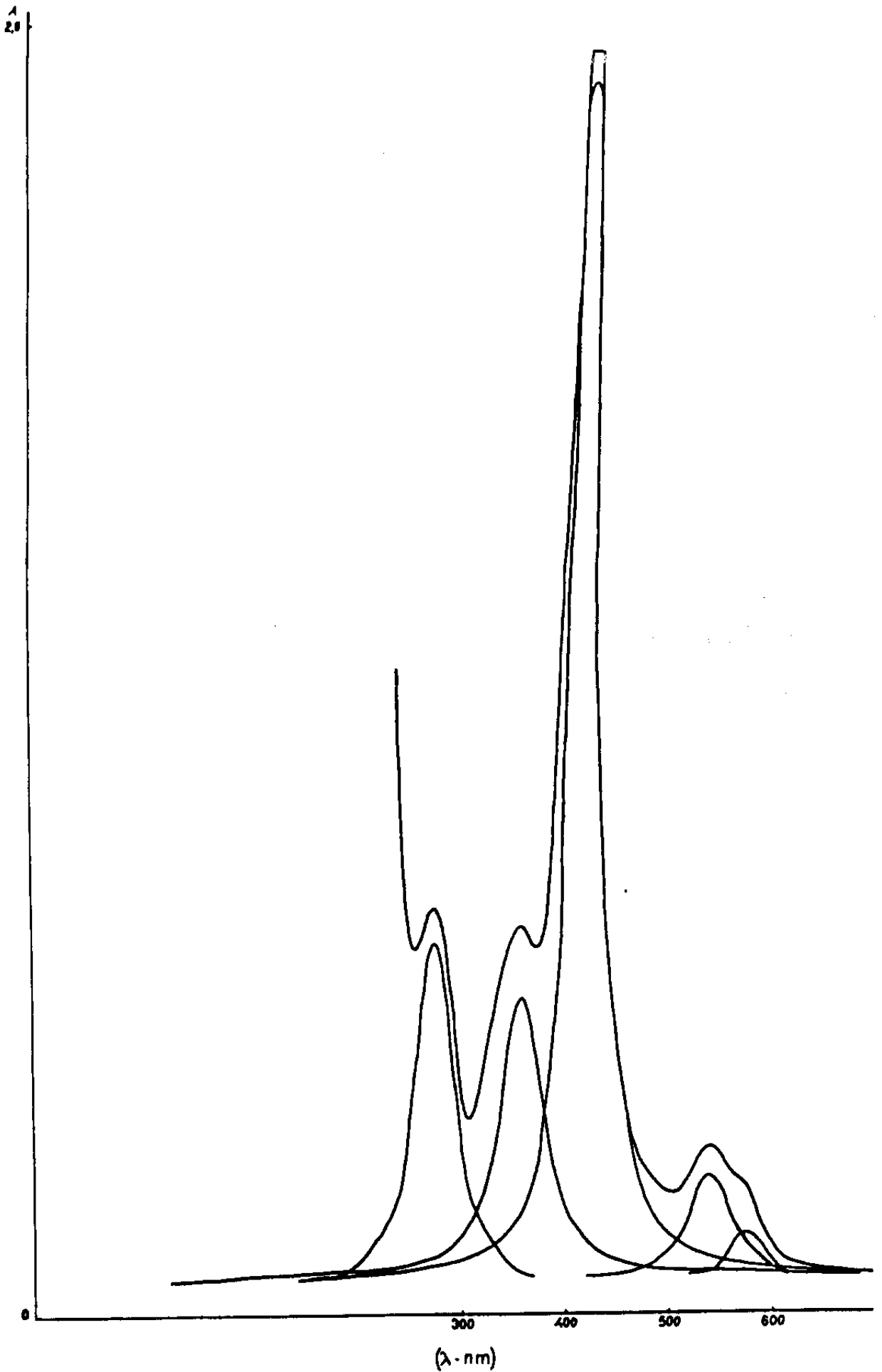


Figura 9 - Espectro de absorção óptica  
hemoglobina humana S

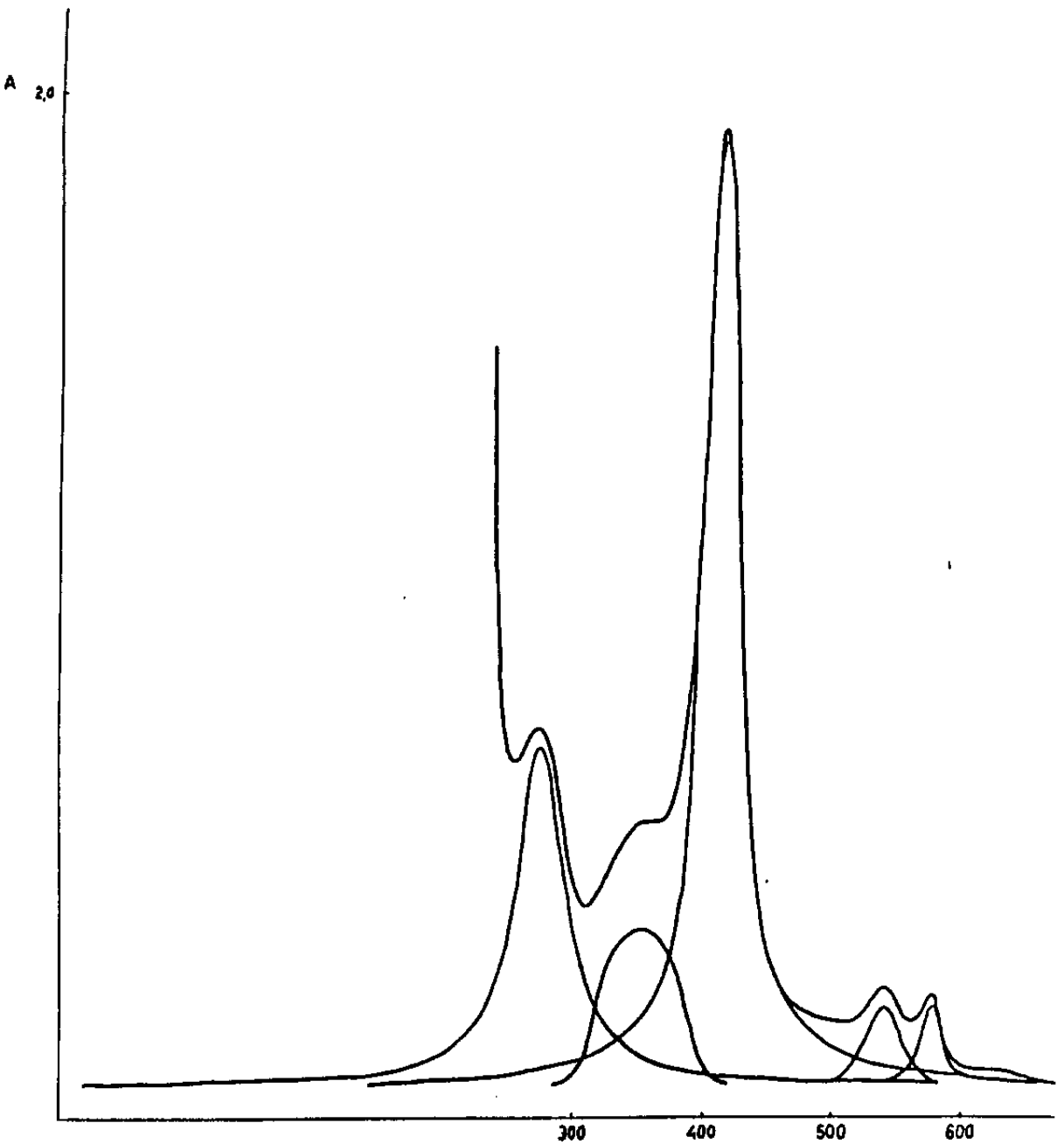


Figura 10 - Espectro de absorção óptica  
hemoglobina de Rana catesbeiana

	Hb A	Hb S	Hb Rana
$\lambda_0 = 275\text{nm}$			
$\Delta\lambda$ (nm)	42,3	42,3	47,0
Forma	g	g+l	l
Intensidade	27,5	28,1	22,9
$\lambda_0 \sim 350\text{nm}$			
$\Delta\lambda$ (nm)	75,3	47,0	70,6
Forma	l	l	g+l
Intensidade	19,8	23,3	10,4
$\lambda_0 \sim 415\text{nm}$			
$\Delta\lambda$ (nm)	27,0	30,6	35,3
Forma	l	l	l
Intensidade	77,3	100	63,7
$\lambda_0 = 540\text{nm}$			
$\Delta\lambda$ (nm)	28,2	42,3	32,9
Forma	g	l	g
Intensidade	7,7	8,5	5,2
$\lambda_0 \sim 575\text{nm}$			
$\Delta\lambda$ (nm)	21,1	37,6	18,8
Forma	l	g+l	l
Intensidade	8,1	3,5	5,2

Tabela 3: Quadro comparativo das linhas espectrais das hemoglobinas humana A, Humana S e de Rana Catesbeiana no intervalo espectral de 250nm a 600nm, onde l indica uma curva próxima a uma Lorentziana e g uma próxima a uma Gaussiana.

V.2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO ÓPTICA - VISÍVEL E ULTRA-VIOLETA PRÓXIMO (Amostra: pastilha de KBr)

Os espectros obtidos são apresentados nas figuras 11, 12 e 13. O espectro da hemoglobina humana A revelou os seguintes  $\lambda$ m: 275nm, 420nm e 530nm. Um espectro com tais linhas de absorção aproxima-se muito do espectro da deoxi - Hb A (tabela 2, capítulo III), isto é, hemoglobina não ligada.

O espectro da Hb S revelou  $\lambda$ m em: 225nm, 350nm, 412nm e 540nm. O da Hb de Rana,  $\lambda$ m em: 420nm e 550nm, também um espectro próximo ao da Hb Rana não ligada.

Com estes dados, podemos inferir que, durante os processos de liofilização e cristalização a hemoglobina passa do estado de oxi- para deoxi-, isto é, a 6<sup>a</sup> posição de coordenação antes ocupada pelo O<sub>2</sub>, fica vazia. Isto vem, em parte, concordar com o fato de que pequenas alterações na região do heme surgem durante os processos de liofilização e cristalização, já mencionado no capítulo III.

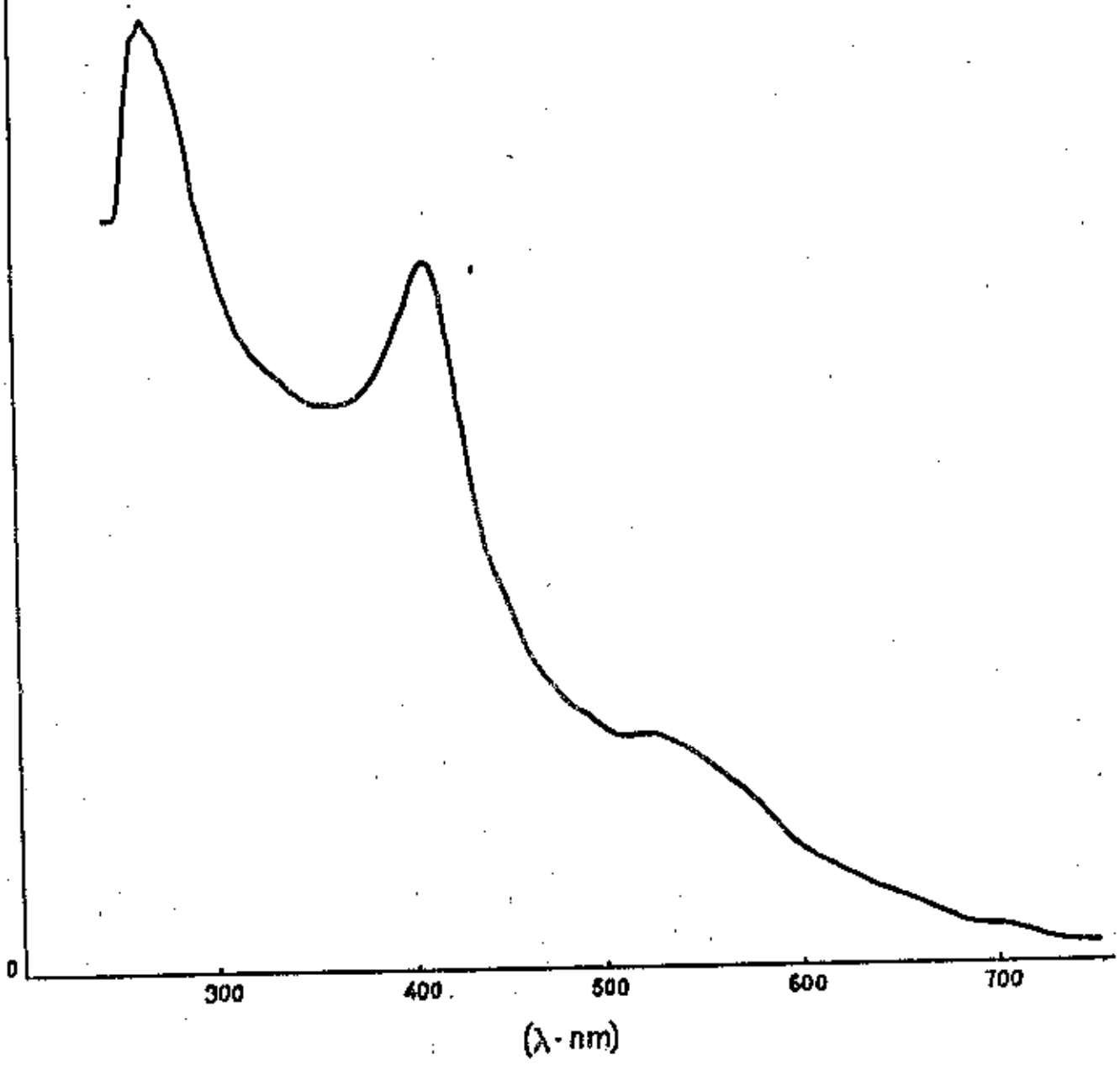


Figura 11 - Espectro de absorção óptica da hemoglobina humana A (pastilha de KBr)

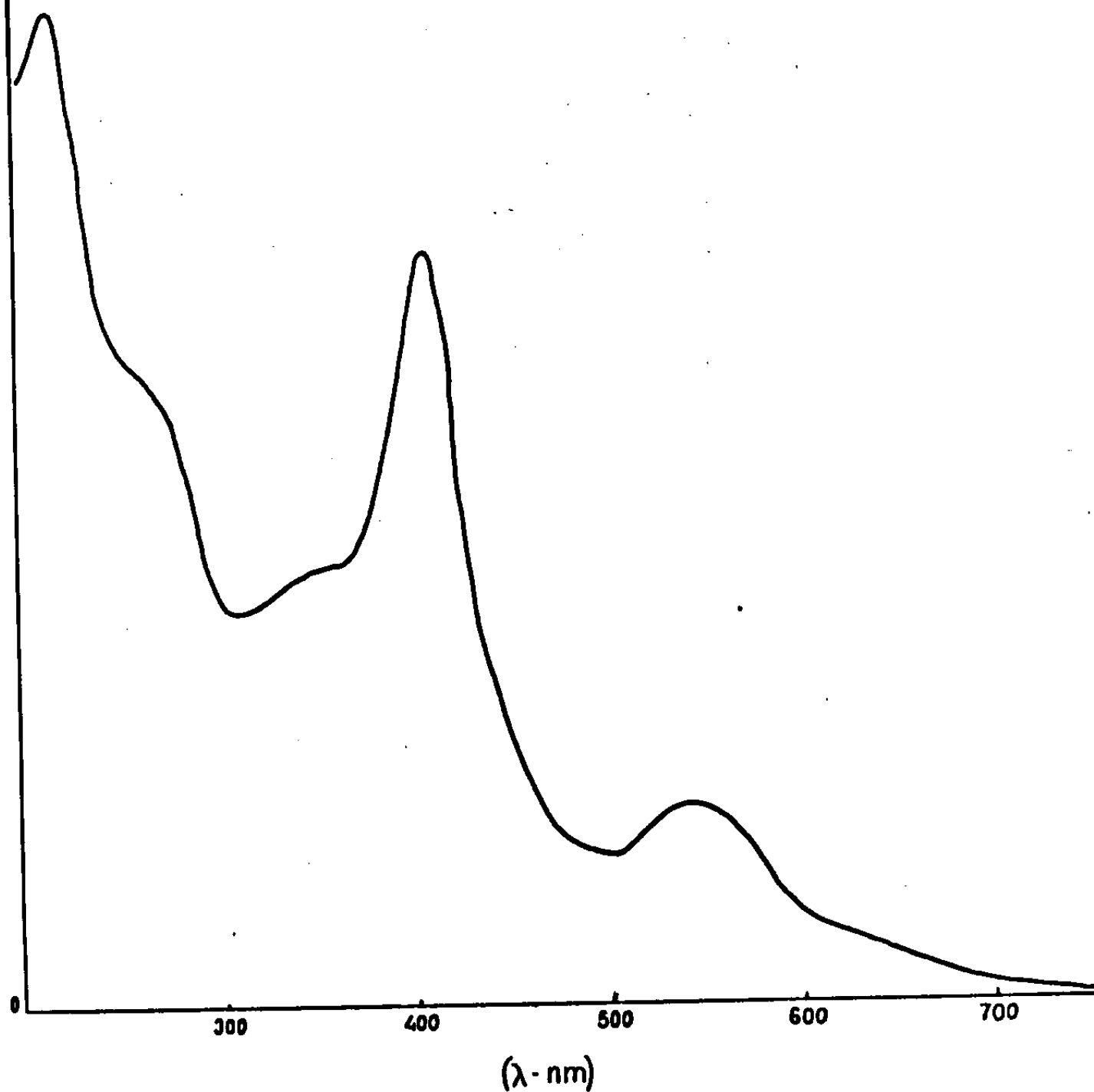


Figura 12 - Espectro de absorção óptica da hemoglobina humana S  
(pastilha de KBr)



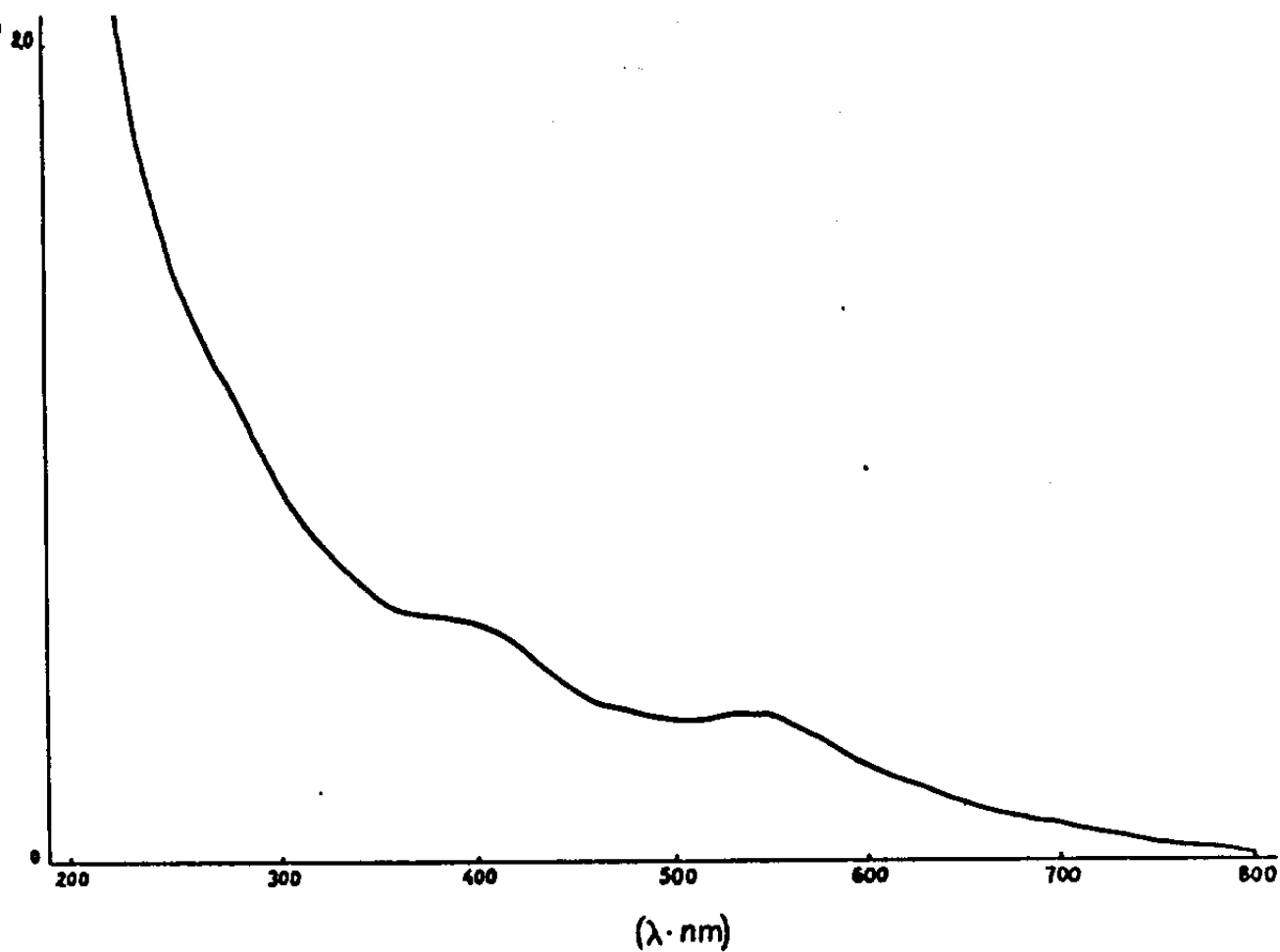


Figura 13 - Espectro de absorção óptica da hemoglobina de Rana catesbeiana (pastilha de KBr)

### V.3. ESPECTROS DE ABSORÇÃO ÓPTICA - INFRAVERMELHO

Foi feita a deconvolução do espectro na região do infravermelho da amostra de hemoglobina humana A, cujos resultados apresentamos a seguir. A partir destes resultados e com o fato de que os espectros apresentam regiões de "similaridade" traçamos alguns comentários visando a comparação entre eles. Ao final, as figuras 14, 15 e 16 apresentam os espectros da hemoglobina humana S, humana A e de Rana catesbeiana, sendo que na figura 12 apresentam-se as curvas teóricas.

#### V.3.1. $4000 \text{ cm}^{-1} - 2000 \text{ cm}^{-1}$

Nesta região espectral, a deconvolução revelou linhas cujas formas são superposição de Gaussianas e Lorentzianas. Ao compararmos os espectros das amostras (hbA, HbS, Hb Rana) observa-se que estes são "similares" e que a intensidade das linhas varia.

$$\bar{\nu}_0 = 3520,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 186,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 7,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-2}$$

$$A_g = 5,03 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 93,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 29,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 21,5$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	19,8	19,5	20,0
40,0	18,0	17,3	16,0
60,0	15,4	14,5	14,0
80,0	12,3	11,8	10,0
100,0	9,2	9,5	9,0
120,0	6,5	7,7	6,0
160,0	2,6	5,1	2,0
180,0	1,5	4,3	1,5
200,0	0,8	3,6	1,0
220,0	0,4	3,1	-

$$\bar{\nu}_0 = 3420,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 140,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 1,41 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-2}$$

$$A_g = 6,70 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$\alpha_\lambda = 70,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_\lambda = 22,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 48,4$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	43,5	42,5	43,5
40,0	36,7	34,6	37,0
80,0	18,6	19,9	19,0
100,0	11,2	15,1	16,5
120,0	10,5	11,6	13,5
140,0	2,8	9,2	11,5
160,0	1,2	7,4	9,5
180,0	0,5	6,0	8,0
200,0	-	5,0	7,0
220,0	-	4,2	5,5
260,0	-	3,1	2,5
320,0	-	2,1	1,0

$$\bar{\nu}_0 = 3320,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 86,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 3,70 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A g = 1,08 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha \ell = 43,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A \ell = 13,8 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 55,3$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	f <sub>ℓ</sub> (x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	45,3	43,2	48,0
40,0	29,0	28,3	28,0
80,0	4,9	11,9	16,0
100,0	1,3	8,3	12,0
120,0	0,2	6,0	10,0
140,0	-	4,5	8,5
160,0	-	3,5	7,0
200,0	-	2,3	5,0
220,0	-	1,9	4,0
260,0	-	1,4	3,0
320,0	-	0,9	1,5
360,0	-	0,7	-

$$\bar{\nu}_0 = 3240,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 53,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 9,75 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 1,76 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 8,5 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 27,3$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,5	21,7	20,6	25,0
20,0	17,6	16,6	16,0
26,6	13,0	13,0	10,0
33,3	8,8	10,1	6,0
40,0	5,4	7,9	4,0
53,3	1,6	5,1	2,0
60,0	0,7	4,2	1,0
66,6	0,3	3,5	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 3180,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,53 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_\ell = 13,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_\ell = 4,23 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 26,3$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,5	12,2	12,2	13,0
20,0	5,2	7,6	8,0
26,6	1,56	5,0	5,5
33,3	0,3	3,4	5,0
40,0	-	2,4	4,0
60,0	-	1,2	2,0
80,0	-	0,6	1,0

$$\bar{\nu}_o = 3130,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 33,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,45 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_\ell = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_\ell = 5,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 22,1$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,5	13,43	12,6	18,0
20,0	7,8	8,5	7,0
26,6	3,7	5,8	4,0
33,3	1,3	4,1	1,5
40,0	0,4	3,0	0,5



$$\bar{\nu}_0 = 3060,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 106,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,44 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 8,81 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 53,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 17,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 35,2$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	28,6	27,6	30,0
40,0	21,3	20,2	26,0
60,0	13,1	14,0	5,5
80,0	6,6	9,7	3,5
100,0	2,7	7,0	2,0
120,0	0,9	5,2	1,0
140,0	0,2	4,0	< 0,5

$$\bar{\nu}_0 = 2960,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 40,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,73 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 2,35 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 20,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 6,36 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 42,1$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,3	29,4	27,7	33,0
20,0	20,0	20,0	20,0
26,6	11,74	14,5	7,5
33,3	5,8	10,6	5,5
40,0	2,5	8,0	3,5
60,0	0,07	4,0	1,0

$$\bar{\nu}_0 = 2930,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 33,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,45 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 5,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 50,0$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,3	30,8	29,0	31,0
20,0	17,8	19,3	15,0
26,6	8,4	13,2	6,0
33,3	3,1	9,4	3,0
40,0	0,9	6,9	-

$$\bar{\nu}_0 = 2880,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 53,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 9,75 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A g = 1,76 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 8,46 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	22,3	21,1	28,0
26,6	16,5	16,5	7,0
40,0	6,9	10,0	5,0
53,3	2,1	6,6	2,5
60,0	0,9	5,4	1,0

$$\bar{\nu}_0 = 2820,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 20,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 6,93 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 4,69 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 10,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 3,18 \text{ cm}^{-1}$$

$$I(\text{U.R.}) = 15,8$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
13,3	4,4	5,4	4,5
20,0	0,9	3,0	2,5
26,6	0,1	1,8	1,5
33,3	-	1,2	1,2
40,0	-	0,8	0,5

V.3.2.  $200 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$

De modo análogo, as linhas se apresentam como superposição de Gaussianas e Lorentzianas. Ao compararmos os espectros notamos: i) a linha que na Hb A apresenta  $\bar{\nu}_0 \approx 1660,0 \text{ cm}^{-1}$ , na HbSS sofre um desvio da ordem de  $20,0 \text{ cm}^{-1}$ , ( $\bar{\nu}_0 = 1640,0 \text{ cm}^{-1}$  ; ii) a intensidade das curvas também varia, mas de um modo geral os espectros são similares.

$$\bar{\nu}_0 = 1660,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 93,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 3,18 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A g = 1,00 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 46,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 14,8 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 100,0$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	92,0	90,8	93,0
20,0	83,6	80,2	84,0
30,0	71,3	67,1	71,0
40,0	57,1	54,7	55,0
50,0	42,9	44,2	43,0
60,0	30,2	35,7	37,0
70,0	20,0	29,1	28,0
80,0	12,4	24,0	22
100,0	3,9	17,0	15,0
120,0	0,9	12,4	10,0
140,0	0,1	9,5	7,0
200,0	-	5,0	5,0
220,0	-	4,0	3,0
260,0	-	2,9	2,0
320,0	-	1,9	-

$$\bar{\nu}_0 = 1540,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 46,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,27 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$Ag = 2,01 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 23,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$Al = 7,41 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 67,4$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	56,3	54,0	54,0
20,0	38,4	36,8	35,0
40,0	8,3	16,2	18,0
50,0	2,6	11,4	15,0
60,0	0,6	8,3	13,0
70,0	0,1	6,3	11,0
80,0	-	5,0	8,0
100,0	-	3,2	7,0
120,0	-	2,3	5,5
160,0	-	1,3	3,0
200,0	-	0,8	1,5
240,0	-	0,6	0,5
260,0	-	0,5	-



$$\bar{\nu}_0 = 1500,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 33,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,45 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 5,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	25,8	24,2	31,0
20,0	12,4	13,4	11,0
23,3	8,7	11,0	8,0
30,0	3,6	7,7	5,0
33,3	2,2	6,5	3,5
40,0	0,6	4,8	3,0
70,0	-	1,7	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 1450,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 23,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 5,10 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$Ag = 4,03 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 11,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$Al = 3,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 31,6$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	f <sub>l</sub> (x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	18,0	17,2	21,0
13,3	12,1	12,9	13,0
20,0	3,9	7,5	5,0
23,3	1,8	5,9	4,0
30,0	0,3	3,8	3,0
33,3	-	3,2	2,0

$$\bar{v}_o = 1415,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{v} = 30,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,08 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,13 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 15,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 4,77 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 29,5$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	20,5	19,4	26,0
16,6	12,0	12,6	12,0
20,0	8,1	10,1	8,0
23,3	5,2	8,2	5,5
30,0	1,7	5,6	2,5
33,3	0,9	4,7	2,0
40,0	0,2	3,4	1,0

$$\bar{\nu}_0 = 1385,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,53 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 13,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 4,23 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 41,6$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	26,7	25,2	24,0
20,0	8,2	12,0	5,0
30,0	1,2	6,5	1,0
40,0	0,7	4,0	0,5
50,0	-	2,6	< 0,5
60,0	-	1,9	-

$$\bar{\nu}_0 = 1358,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 23,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 5,10 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 4,03 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 11,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 3,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 25,8$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	14,7	14,0	16,0
20,0	3,2	6,2	2,0
30,0	0,2	3,2	0,5
40,0	-	1,9	< 0,5
50,0	-	1,2	-

$$\bar{\nu}_o = 1328,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 33,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 2,45 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha \lambda = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A \lambda = 5,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 28,4$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	21,1	19,8	22,0
20,0	10,1	11,0	7,5
30,0	3,0	6,3	3,0
33,3	1,8	5,3	2,5
40,0	0,5	4,0	1,0
50,0	-	2,6	-

$$\bar{\nu}_o = 1300,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 23,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 5,10 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 4,03 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha \ell = 11,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A \ell = 3,70 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	26,5	25,0	26,5
10,0	19,8	19,0	14,5
16,6	8,1	10,8	8,0
20,0	4,3	8,3	4,5
30,0	0,3	4,3	1,0
40,0	-	2,5	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 1270,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 33,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,45 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 5,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	29,6	28,5	30,0
10,0	25,8	24,2	26,0
13,3	21,4	20,1	21,0
20,0	12,4	13,4	6,0
30,0	3,6	7,7	1,5
33,3	2,2	6,5	0,5
40,0	0,6	4,8	< 0,5



$$\bar{\nu}_0 = 1245,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,00 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-2}$$

$$A g = 5,66 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-2}$$

$$\alpha \lambda = 8,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A \lambda = 2,64 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 38,9$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	13,5	15,1	15,0
16,6	2,3	7,4	6,0
20,0	0,6	5,4	4,0
30,0	-	2,6	3,5
33,3	-	2,1	2,0
40,0	-	1,5	1,5
50,0	-	1,0	0,5

$$\bar{\nu}_o = 1220,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 16,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 1,00 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 5,66 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-2}$$

$$\alpha_\ell = 8,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_\ell = 2,64 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 38,4$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	23,5	22,4	23,0
10,0	13,3	14,9	10,0
13,3	6,1	10,2	4,0
20,0	0,6	5,3	2,0
30,0	-	2,6	0,5
33,3	-	2,1	-

$$\bar{\nu}_o = 1190,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 30,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_{g} = 3,08 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_{g} = 3,13 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-2}$$

$$\alpha_{\ell} = 15,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_{\ell} = 4,77 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 31,6$$

$x$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$f_g(x)$ (U.A.)	$f_{\ell}(x)$ (U.A.)	$f_e(x)$ (U.A.)
10,0	22,0	20,7	22,0
16,6	12,8	13,5	13,0
20,0	8,7	10,8	9,0
30,0	1,8	6,0	3,0
33,3	0,9	5,0	2,0
40,0	0,2	3,7	1,0
50,0	-	2,4	0,5

$$\bar{\nu}_o = 1160,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 30,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,08 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,13 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$$

$$\alpha_l = 15,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 4,77 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 36,8$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	25,7	24,2	25,0
20,0	10,2	12,6	10,5
30,0	2,2	7,0	2,5
40,0	0,2	4,3	1,0
50,0	-	2,8	0,5
60,0	-	2,0	-

$$\begin{aligned} \bar{\nu}_0 &= 1110,0 \text{ cm}^{-1} & \Delta\bar{\nu} &= 60,0 \text{ cm}^{-1} \\ \alpha_g &= 7,70 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 & A_g &= 1,56 \times 10^{-2} \text{ cm} \\ \alpha_l &= 30,0 \text{ cm}^{-1} & A_l &= 9,54 \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 49,5$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	34,5	32,5	34,5
30,0	23,5	23,5	19,0
40,0	13,7	16,9	7,0
50,0	6,8	12,4	2,0
60,0	2,9	9,4	1,5
70,0	1,0	7,3	1,0
80,0	0,3	5,8	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 1060,0 \text{ cm}^{-1} \qquad \Delta\bar{\nu} = 46,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,27 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \qquad Ag = 2,01 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 23,3 \qquad Al = 7,42 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	29,0	27,8	29,0
13,3	26,3	24,9	26,0
20,0	19,8	19,0	19,0
30,0	10,5	12,4	10,0
40,0	4,3	8,3	3,0
50,0	1,3	5,8	1,5
60,0	0,3	4,3	-

$$\bar{\nu}_0 = 1020,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 40,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 1,73 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,35 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 20,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 6,36 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 30,5$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	26,8	26,1	26,0
13,3	21,3	20,1	20,0
20,0	14,5	14,5	12,0
30,0	6,1	8,9	3,5
33,3	4,2	7,7	3,0
40,0	1,8	5,8	1,5
50,0	0,3	4,0	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 990,0 \text{ cm}^{-1} \qquad \Delta\bar{\nu} = 20,0 \text{ cm}^{-1} \quad |$$

$$\alpha = 6,93 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \qquad Ag = 4,69 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha\ell = 10,0 \text{ cm}^{-1} \qquad A\ell = 3,18 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 22,1$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	10,5	10,5	11,0
13,3	6,2	7,6	8,0
16,6	3,1	5,6	5,0
20,0	1,3	4,2	3,0
30,0	-	2,1	1,5
33,3	-	1,7	0,5
40,0	-	1,2	-



V.3.3.  $900 \text{ cm}^{-1} - 250 \text{ cm}^{-1}$

|

Como nos outros intervalos considerados, as curvas se apresentam como superposição de Lorentzianas e Gaussianas. A intensidade das linhas também varia. A linha que tanto na Hb A como Hb Rana apresenta  $\bar{\nu}_0 = 760 \text{ cm}^{-1}$ , na HbS ela praticamente desaparece.

$$\bar{\nu}_0 = 760,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 36,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 2,07 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,56 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 18,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 5,82 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 60,0$$

x (cm <sup>-1</sup> )	f <sub>g</sub> (x) (U.A.)	f <sub>l</sub> (x) (U.A.)	f <sub>e</sub> (x) (U.A.)
10,0	46,3	44,0	44,0
20,0	25,0	26,0	25,0
30,0	8,8	15,5	10,0
50,0	0,3	6,7	3,0
60,0	-	4,8	1,5
70,0	-	3,6	0,5
80,0	-	2,8	-

$$\bar{\nu}_0 = 700,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 40,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 1,73 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,35 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 20,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 6,36 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 29,5$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	23,5	22,4	23,5
13,3	20,6	19,4	19,0
20,0	14,0	14,0	13,0
30,0	5,8	8,6	6,0
33,3	4,1	7,4	4,0
40,0	1,8	5,6	2,5
50,0	0,4	3,8	1,0

$$\bar{\nu}_0 = 650,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 53,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 9,75 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 1,76 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 8,46 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 33,7$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
20,0	21,6	20,5	24,5
30,0	13,3	14,2	13,0
40,0	6,7	9,9	7,0
50,0	2,8	7,0	3,5
60,0	0,9	5,2	2,0
70,0	0,2	4,0	1,0
80,0	-	3,2	-

$$\bar{\nu}_0 = 580,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 83,4 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,98 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 1,13 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 41,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 13,25 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 38,9$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	35,5	35,0	36,5
20,0	31,5	30,0	34,5
30,0	25,8	24,4	31,5
40,0	19,5	19,2	19,0
50,0	13,6	15,1	7,0
60,0	8,8	12,0	2,0
70,0	5,2	9,6	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 520,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 46,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 1,27 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 2,01 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 23,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 7,4 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 37,4$$

$x$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$f_g(x)$ (U.A.)	$f_l(x)$ (U.A.)	$f_e(x)$ (U.A.)
10,0	31,2	30,0	32,5
20,0	21,3	20,5	22,5
30,0	11,2	13,3	8,0
40,0	4,6	9,0	4,0
50,0	1,5	6,3	2,0
60,0	0,3	4,6	1,0
70,0	-	3,3	-

$$\bar{\nu}_0 = 470,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 43,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,48 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 2,17 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha \ell = 21,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$A \ell = 6,87 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 34,2$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
10,0	28,0	26,7	30,0
20,0	18,0	17,5	23,0
26,6	11,4	13,0	6,0
33,3	6,3	9,6	3,0
40,0	3,0	7,3	2,0
50,0	0,8	5,1	0,5
53,3	0,4	4,5	-

$$\bar{\nu}_0 = 435,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,53 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 13,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 4,23 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 27,9$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	22,3	21,3	24,0
13,3	13,2	13,2	6,0
20,0	5,5	8,1	3,0
26,6	1,7	5,3	2,0
33,3	0,3	3,6	1,0
40,0	-	2,6	0,5
46,6	-	2,0	-



$$\bar{\nu}_0 = 400,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 40,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha g = 1,73 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A g = 2,35 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha l = 20,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$A l = 6,36 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 25,2$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	22,2	21,6	23,5
10,0	20,2	19,2	22,0
13,3	17,6	16,6	20,0
20,0	12,0	12,0	10,0
26,6	7,0	8,6	3,0
30,0	5,0	7,4	1,5
33,3	3,5	6,4	0,5

$$\bar{\nu}_0 = 360,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\Delta\bar{\nu} = 26,6 \text{ cm}^{-1}$$

$$\alpha_g = 3,92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$A_g = 3,53 \times 10^{-2} \text{ cm}$$

$$\alpha_l = 13,3 \text{ cm}^{-1}$$

$$A_l = 4,23 \text{ cm}^{-1}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 25,2$$

x ( $\text{cm}^{-1}$ )	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,6	20,2	19,2	22,0
10,0	16,2	15,3	18,0
13,3	12,0	12,0	7,0
20,0	5,0	7,4	3,5
30,0	0,7	3,9	1,0
33,3	0,3	3,3	0,5

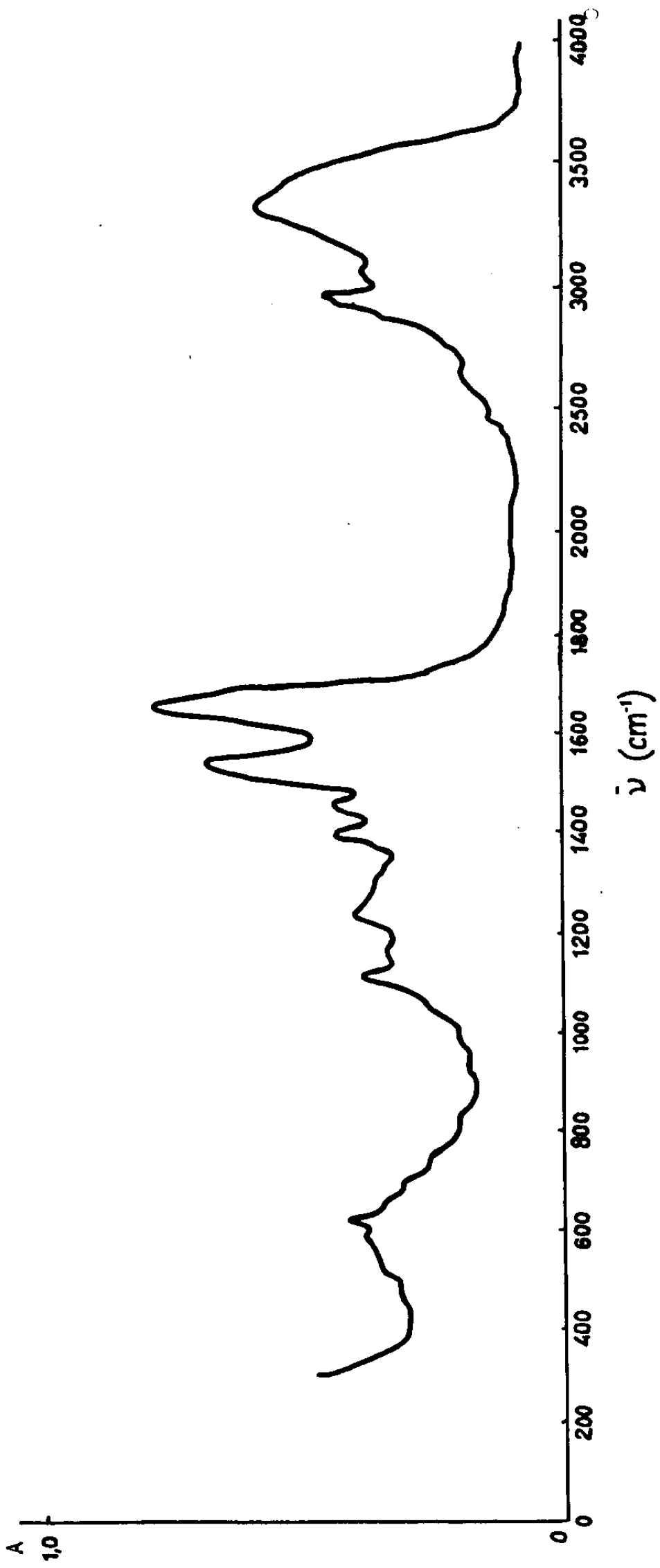


Figura 14 - Espectro de absorção óptica  
hemoglobina humana S

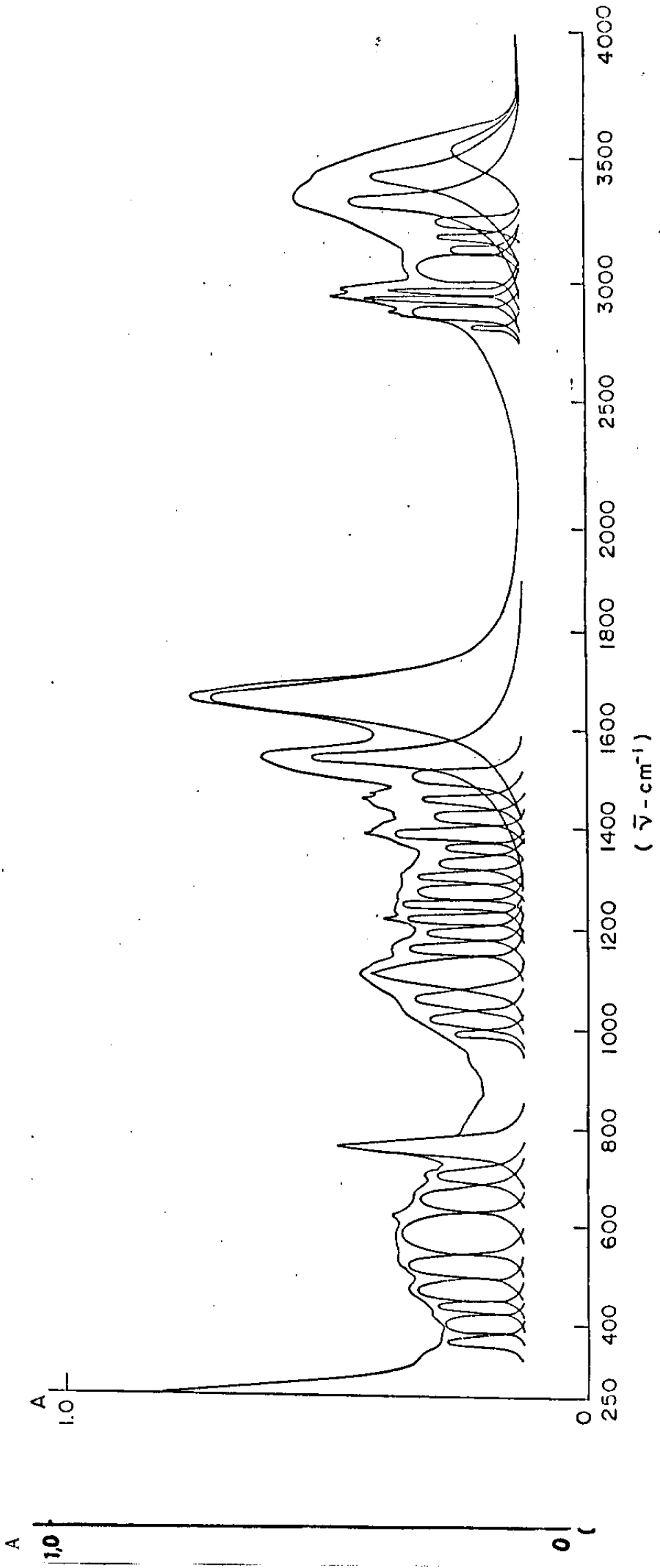


Figura 15 - Espectro de absorção óptica hemoglobina humana A

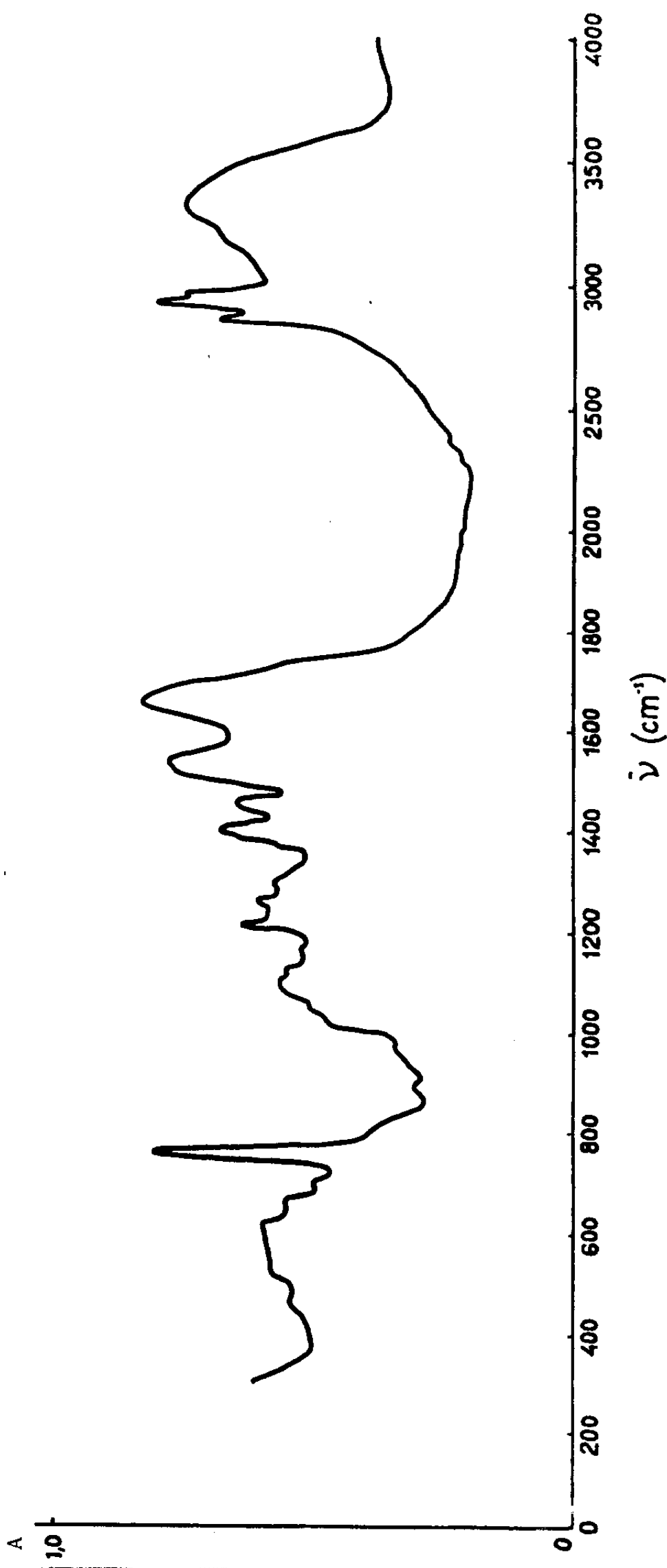


Figura 16 - Espectro de absorção óptica  
hemoglobina de Rana catesbeiana

#### V.4. ESPECTROS FOTOACÚSTICOS - VISÍVEL

O espectro fotoacústico das amostras revelou muitas linhas de absorção como exposto a seguir:

##### V.4.1. Hemoglobina Humana A

As linhas obtidas foram  $\lambda_0 = 338,6\text{nm}; 368,3\text{nm}; 410,0\text{nm}; 445,5\text{nm}; 460,1\text{nm}; 479,0\text{nm}; 491,1\text{nm}; 513,3\text{nm}; 538,6\text{nm}$  e  $570,8\text{nm}$ .

$$\lambda_o = 338,6\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 48,10\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,19 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,95 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 24,05\text{nm}$$

$$A_l = 7,65\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 36,7$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,3	47,6	46,7	48,0
12,6	41,4	39,2	43,0
19,0	32,7	30,9	34,0
25,3	23,3	23,7	22,0
31,6	15,2	18,3	10,0
38,0	9,0	14,3	4,0
44,3	4,8	11,4	-
50,6	2,3	9,2	-

$$\lambda_0 = 368,3\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 32,9\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,55 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,85 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 16,45\text{nm}$$

$$A_\ell = 5,24\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 19,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,3	23,5	22,6	24,0
12,6	17,3	16,4	18,0
19,0	10,4	11,1	10,0
25,3	5,0	7,7	4,0
31,6	2,0	5,5	2,0
38,0	0,6	4,1	1,0
44,3	0,1	3,1	-



$$\lambda_0 = 410,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 48,1\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,19 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,95 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 24,05\text{nm}$$

$$A_\lambda = 7,65\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 66,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,3	85,8	84,2	87,0
12,6	74,5	70,6	75,0
19,0	58,8	55,4	59,0
25,3	42,0	42,7	42,0
31,6	27,4	33,0	28,0
38,0	16,3	25,7	17,0
44,3	8,7	20,5	9,0
50,6	4,2	16,6	5,0
63,3	0,7	11,3	1,0
69,2	0,2	9,7	< 0,5

$$\lambda_0 = 445,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 16,45\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,02 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 5,70 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 8,2\text{nm}$$

$$A_\ell = 2,62\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 12,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	14,6	14,0	15,0
7,6	9,4	9,1	9,5
11,4	4,5	5,8	6,0
15,2	1,6	3,8	3,0
19,0	0,4	2,6	1,5
22,8	-	1,9	-
25,3	-	1,6	-

$$\lambda_0 = 460,1 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 12,6 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 1,73 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 7,42 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 6,3 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 2,00 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 14,7$$

x	fg(x)	fℓ(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
3,8	15,6	14,6	16,0
7,6	7,4	8,1	7,5
11,4	2,1	4,6	2,0
15,2	0,3	3,0	0,5
19,0	-	2,0	-

$$\lambda_0 = 479,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 19,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 7,68 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$\alpha_g = 4,94 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 9,5\text{nm}$$

$$\alpha_l = 3,02\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 14,0$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	17,0	16,3	18,0
7,6	12,2	11,5	13,0
11,4	7,0	7,8	7,5
15,2	3,2	5,3	4,0
19,0	1,2	3,8	1,0
22,8	0,3	2,8	< 0,5

$$\lambda_0 = 491,1\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 11,4\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,13 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 8,24 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 5,7\text{nm}$$

$$A_l = 1,81\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 9,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	9,5	9,0	9,5
7,6	3,8	4,7	4,0
11,4	0,8	2,7	1,0
12,6	0,4	2,2	< 0,5

$$\lambda_0 = 513,3\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 25,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 4,32 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,71 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 12,65\text{nm}$$

$$A_\ell = 4,02\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 11,0$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	14,0	13,7	14,0
7,6	11,7	11,0	11,5
11,4	8,5	8,2	8,5
15,2	5,5	6,1	5,5
19,0	3,2	4,6	3,0
22,8	1,5	3,5	1,5
25,3	0,9	3,0	1,0

$$\lambda_0 = 538,6 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 30,4 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 3,00 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,09 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 15,2 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 4,83 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 22,0$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,3	26,6	25,6	26,0
12,6	18,6	17,8	18,0
19,0	10,3	11,7	10,0
25,3	4,4	7,9	4,0
31,6	1,5	5,6	1,5
38,0	0,4	4,1	0,5
44,3	0,08	3,1	-

$$\lambda_0 = 570,8\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 24,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 4,79 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,90 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 12,0\text{nm}$$

$$A_\ell = 3,82\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 22,0$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	28,0	27,2	28,0
7,6	22,7	21,4	21,0
11,4	16,1	15,7	16,0
15,2	10,0	11,5	10,0
19,0	5,4	8,5	6,0
22,8	2,5	6,5	2,5
31,6	0,2	3,7	1,0



#### V.4.2. Hemoglobina Humana S

As bandas de absorção detectadas são em  $\lambda_o = 347,5\text{nm}$ ;  $377,5\text{nm}$ ;  $416,6\text{nm}$ ;  $450,0\text{nm}$ ;  $465,0\text{nm}$ ;  $480,0\text{nm}$ ;  $500,0\text{nm}$ ;  $581,6\text{nm}$  e  $545,0\text{nm}$ .

$$\lambda_0 = 347,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 20,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 6,93 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 4,70 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 10,0\text{nm}$$

$$A_\ell = 3,18\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 42,6$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
5,0	48,7	46,4	47,0
10,0	29,0	29,0	29,0
15,0	12,2	17,8	14,0
20,0	3,6	11,6	6,0
25,0	0,7	8,0	3,0
30,0	0,1	5,8	1,5
41,6	-	3,1	-

$$\lambda_0 = 377,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 46,6\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,27 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,01 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 23,3\text{nm}$$

$$A_l = 7,42\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 36,7$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
8,3	45,8	44,3	43,0
16,6	35,2	33,1	32,0
25,0	22,6	23,2	21,0
33,3	12,2	16,4	12,0
41,6	5,5	11,9	5,5
50,0	2,0	8,9	2,5
58,3	0,6	6,8	1,0

$$\lambda_0 = 416,6\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 36,6\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,06 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,56 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 18,3\text{nm}$$

$$A_\lambda = 5,82\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 100,0$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
8,3	118,0	112,8	116,0
16,6	77,0	74,6	77,0
25,0	37,5	47,5	38,0
33,3	13,8	31,5	14,0
41,6	3,8	22,0	5,0
50,0	0,7	16,0	1,0
58,3	0,1	12,2	-

$$\lambda_o = 450,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 15,0\text{nm}$$

$$\alpha g = 1,23 \times 10^{-2} \text{nm}^{-2}$$

$$A g = 6,26 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha \ell = 7,5\text{nm}$$

$$A \ell = 2,38\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 18,4$$

x	fg(x)	fℓ(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
5,0	18,4	17,3	21,0
10,0	7,3	9,0	8,0
15,0	1,5	5,0	2,0
20,0	0,1	3,0	< 0,5

$$\lambda_0 = 465,0 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 16,6 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 1,00 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$A_g = 5,65 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 8,3 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 2,64 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 17,6$$

x (nm)	f <sub>g</sub> (x) (U.A.)	f <sub>ℓ</sub> (x) (U.A.)	f <sub>e</sub> (x) (U.A.)
5,0	18,7	17,6	19,5
10,0	8,8	9,7	7,0
15,0	2,5	5,6	1,0
20,0	0,4	3,5	-

$$\lambda_0 = 480,0 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 16,6 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 1,00 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 5,65 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 8,3 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 2,64 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 19,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
5,0	12,5	19,0	13,0
10,0	5,8	10,6	6,0
15,0	1,6	6,0	1,5
20,0	0,2	3,8	< 0,5

$$\lambda_o = 500,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 33,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 2,50 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,82 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 16,65\text{nm}$$

$$A_\ell = 5,30\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 16,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
5,0	20,6	20,1	20,5
10,0	17,1	16,1	16,0
15,0	12,5	12,1	12,5
20,0	8,0	9,0	9,0
25,0	4,6	6,7	5,5
33,3	1,3	4,4	1,0
41,6	0,2	3,0	-



$$\lambda_0 = 545,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 43,3\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,47 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,16 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 21,65\text{nm}$$

$$A_\ell = 6,89\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 19,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
8,3	23,5	22,6	22,0
16,6	17,3	16,3	17,0
25,0	10,3	11,1	11,0
33,3	5,0	7,7	6,0
41,6	2,0	5,5	2,0
50,0	0,6	3,9	0,5
58,3	0,1	3,1	-

$$\lambda_0 = 581,6\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 30,0\text{nm}$$

$$\alpha_g = 3,08 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A_g = 3,13 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 15,0\text{nm}$$

$$A_\ell = 4,77\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 17,6$$

x	fg(x)	fℓ(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
5,0	22,2	21,6	22,0
10,0	17,6	16,6	17,5
15,0	12,0	12,0	12,0
16,0	10,2	10,7	10,0
25,5	3,5	6,1	4,0
33,3	0,7	4,0	1,0
41,6	0,1	2,7	-

#### V.4.3. Hemoglobina de Rana Catesbeiana

Os picos máximos de absorção foram em:

$\lambda_o = 350,0\text{nm}; 416,0\text{nm}; 457,0\text{nm}; 475,6\text{nm}; 488,5\text{nm}; 500,0\text{nm}$  ;  
514,0nm; 543,5nm e 580,0nm.

$$\lambda_0 = 350,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 69,2\text{nm}$$

$$\alpha_g = 5,78 \times 10^{-4} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 1,35 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 34,6\text{nm}$$

$$A_\lambda = 11,01\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 41,9$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
12,8	51,8	50,1	53,0
25,6	39,0	36,7	42,0
38,5	24,2	25,3	20,0
51,3	12,5	17,7	8,0
64,1	5,3	12,8	4,0
77,0	1,8	9,5	1,0
83,3	1,0	8,3	-

$$\lambda_0 = 416,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 46,1\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,30 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,03 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\lambda = 23,05\text{nm}$$

$$A_\lambda = 7,33\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 77,2$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fλ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,4	99,5	97,4	101,0
12,8	84,8	80,2	85,0
19,2	65,0	61,9	65,0
25,6	44,9	47,0	49,0
32,0	27,7	35,8	30,0
38,5	15,3	27,6	15,0
44,8	7,7	21,9	8,0
51,3	3,4	17,6	4,0
64,1	0,5	12,0	0,5

$$\lambda_0 = 457,0 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 16,6 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 9,97 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 5,63 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 8,3 \text{ nm}$$

$$A_\ell = 2,64 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 19,1$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,4	17,3	16,3	16,5
12,8	5,1	7,6	5,0
19,2	0,6	4,0	0,5
21,8	0,2	3,3	< 0,5

$$\lambda_0 = 475,6 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 17,9 \text{ nm}$$

$$\alpha_g = 8,60 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 5,23 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 8,95 \text{ nm}$$

$$A_l = 2,84 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 20,6$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fl(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	24,7	23,7	26,0
7,7	16,8	16,0	19,0
11,5	8,9	10,5	9,0
15,4	3,6	7,0	3,5
19,2	1,2	4,9	1,0
23,0	0,3	3,6	< 0,5

$$\lambda_o = 488,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 11,5\text{nm}$$

$$\alpha g = 2,08 \times 10^{-2} \text{nm}^{-2}$$

$$A g = 8,14 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha l = 5,75\text{nm}$$

$$A l = 1,83\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 17,6$$

x	fg(x)	fl(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
3,8	17,7	16,7	17,5
7,7	7,0	8,6	7,0
11,5	1,5	4,8	1,5
15,4	0,1	2,9	-



$$\lambda_0 = 500,0 \text{ nm}$$

$$\Delta\lambda = 12,8 \text{ nm}$$

$$\alpha g = 1,68 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-2}$$

$$A g = 7,32 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha \ell = 6,4 \text{ nm}$$

$$A \ell = 2,03 \text{ nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 18,4$$

x	fg(x)	fℓ(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
3,8	19,6	18,4	20,0
7,7	9,2	10,2	9,0
11,5	2,7	5,9	3,0
15,4	0,4	3,6	0,5

$$\lambda_0 = 514,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 17,9\text{nm}$$

$$\alpha_g = 8,60 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-3}$$

$$A_g = 5,23 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_l = 8,95\text{nm}$$

$$A_l = 2,85\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 12,5$$

x	fg(x)	fl(x)	fe(x)
(nm)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)
3,8	15,0	14,4	14,0
7,7	10,2	9,7	10,0
11,5	5,4	6,4	6,0
15,4	2,2	4,3	3,0
19,2	0,7	3,0	0,5
23,0	0,1	2,2	-

$$\lambda_0 = 543,5\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 41,02\text{nm}$$

$$\alpha_g = 1,64 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$$

$$A_g = 2,29 \times 10^{+2} \text{ nm}^{-1}$$

$$\alpha_\ell = 20,51\text{nm}$$

$$A_\ell = 6,53\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 26,4$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
6,4	33,6	32,8	33,5
12,8	27,5	26,0	26,5
19,2	19,6	19,1	19,0
25,6	12,3	14,0	13,0
32,0	6,7	10,5	7,0
44,8	1,4	6,2	2,0
57,7	0,1	4,0	< 0,5

$$\lambda_o = 580,0\text{nm}$$

$$\Delta\lambda = 25,6\text{nm}$$

$$\alpha g = 4,21 \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$$

$$A g = 3,66 \times 10^{-2} \text{nm}^{-1}$$

$$\alpha \ell = 12,8\text{nm}$$

$$A \ell = 4,07\text{nm}$$

$$I \text{ (U.R.)} = 23,5$$

x (nm)	fg(x) (U.A.)	fℓ(x) (U.A.)	fe(x) (U.A.)
3,8	30,1	29,4	30,5
7,7	24,9	23,5	24,5
11,5	18,3	17,7	18,0
15,4	11,8	13,1	12,0
19,2	6,7	9,8	7,5
25,6	2,0	6,4	4,0
32,0	0,4	4,4	1,0

Os espectros fotoacústicos das hemoglobinas humana A, humana S e de Rana catesbeiana, assim como as curvas teóricas, são apresentados nas figuras 17, 18 e 19 respectivamente.

Podemos levantar algumas observações:

- i) quanto ao  $\lambda_m$ : existem desvios dos  $\lambda_m$  do espectro de uma hemoglobina para outro, o que provavelmente seja resultado de diferenças estruturais nas diferentes hemoglobinas estudadas. Isto vem a confirmar a hipótese: diferença estrutural  $\rightarrow$  desvios nos espectros.
- ii) algumas larguras de linha são comparáveis como por exemplo a linha em torno de 450,0 nm:  $\Delta\lambda$  varia de 15,0nm a 16,6nm. Se tomarmos como exemplo a linha em torno de 345,0nm a variação em  $\Delta\lambda$  é maior: de 69,2nm a 20,0nm.
- iii) a forma das linhas apresenta uma grande "variedade"; por exemplo a linha com  $\lambda_m$  em torno de 412,0nm: aproxima-se de uma Gaussiana para as amostras de Hb A e Hb S e como a superposição de uma Lorentziana e uma Gaussiana para a Hb Rana.

Um quadro comparativo dos resultados obtidos após a deconvolução e cálculo teórico das linhas de absorção é apresentado na tabela 4.

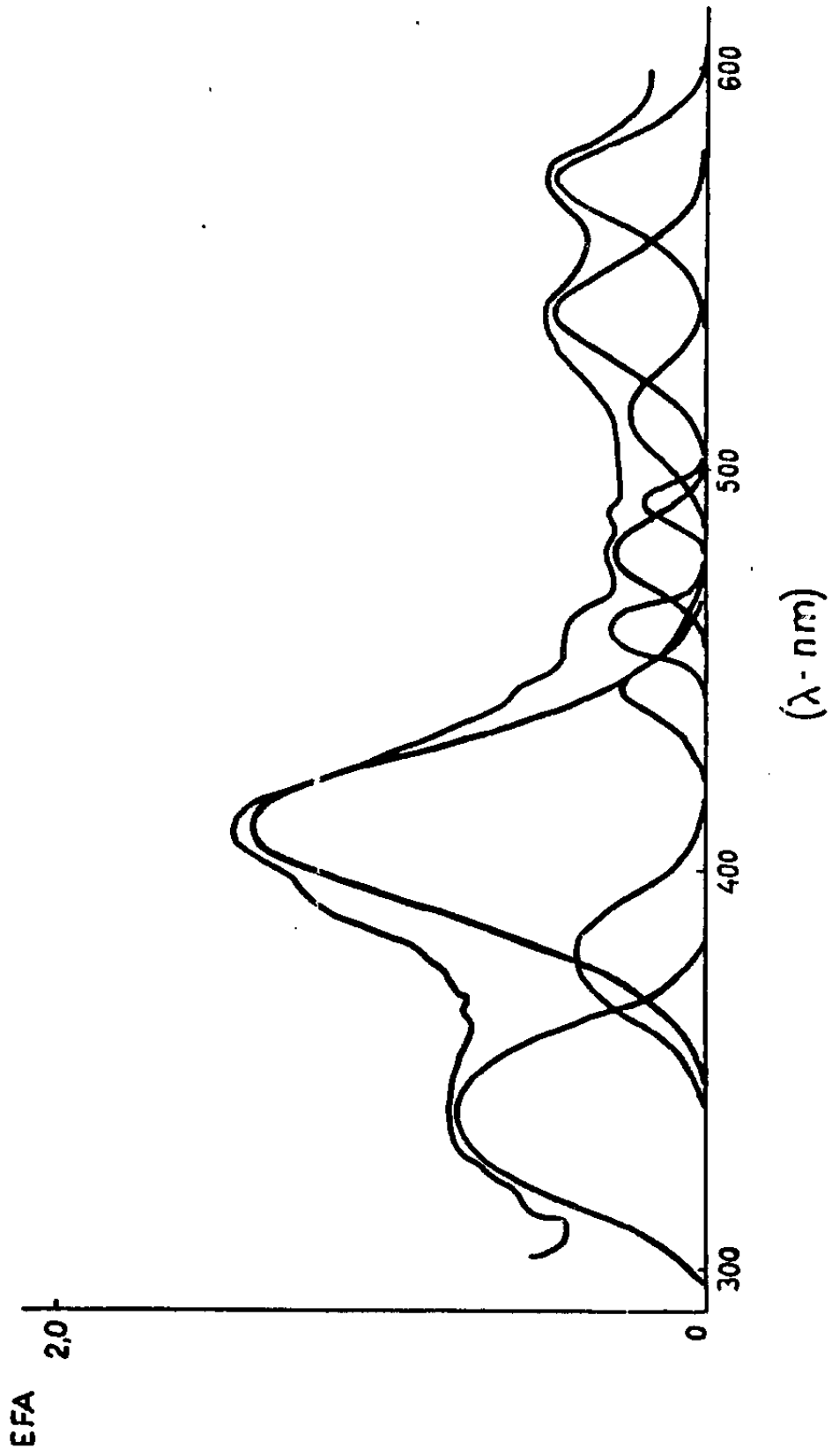
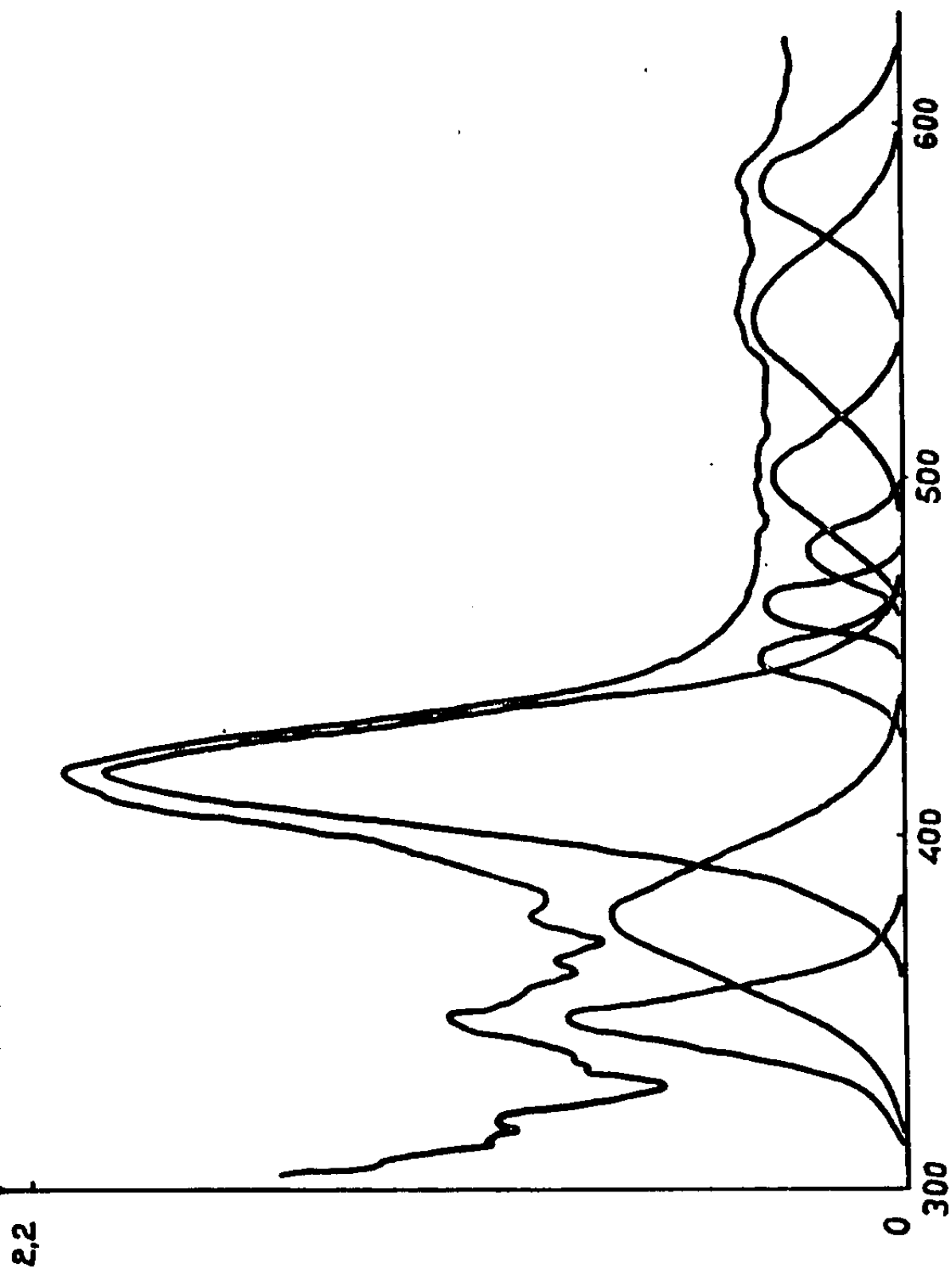


Figura 17 - Espectro Fotoacústico  
hemoglobina humana A



( $\lambda \cdot \text{nm}$ )

Figura 18 - Espectro Fotoacústico  
hemoglobina humana S

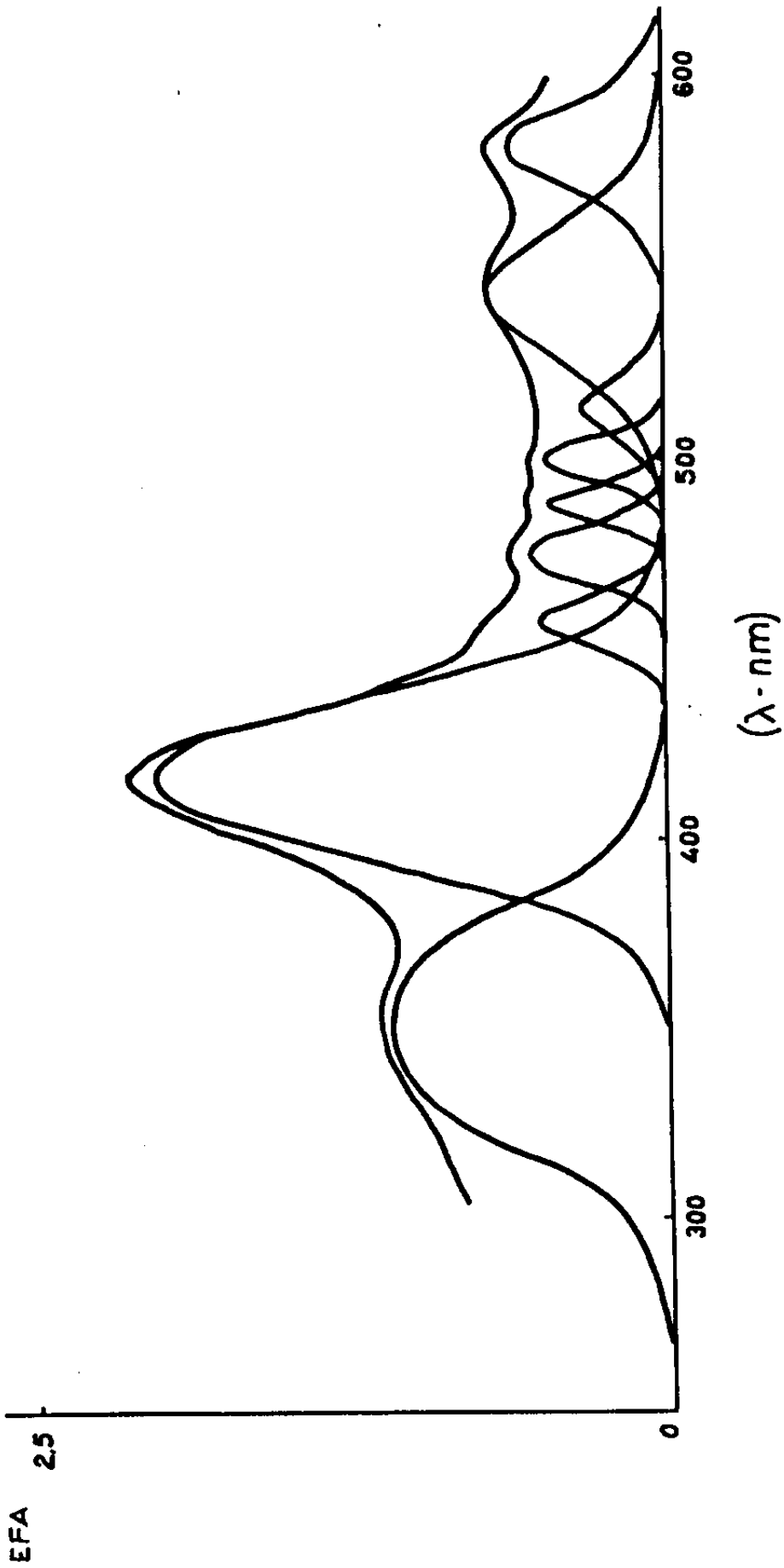


Figura 19 - Espectro Fotoacústico  
hemoglobina de Rana catesbeiana



	Hb A	Hb S	Hb Rana
$\lambda_o$	338,6	347,5	350,0
$\Delta\lambda$ (nm)	48,1	20,0	69,2
Forma	g	g+l	g+l
Intensidade	36,7	42,6	41,9
$\lambda_o$	368,3	377,5	
$\Delta\lambda$ (nm)	32,9	46,6	
Forma	g	g+l	
Intensidade	19,1	36,7	
$\lambda_o$	410,0	416,6	416,0
$\Delta\lambda$ (nm)	48,1	36,6	46,1
Forma	g	g	g+l
Intensidade	66,1	100,0	77,2
$\lambda_o$	445,5	450,0	457,0
$\Delta\lambda$ (nm)	16,45	15,0	16,6
Forma	g+l	g	g+l
Intensidade	12,5	18,4	19,1
$\lambda_o$	460,1	465,0	475,6
$\Delta\lambda$ (nm)	12,6	16,6	17,9
Forma	g	g	g+l
Intensidade	14,7	17,6	20,6
$\lambda_o$	479,0	480,0	488,5
$\Delta\lambda$ (nm)	19,0	16,6	11,5
Forma	g+l	g	g
Intensidade	14,0	19,1	17,6
$\lambda_o$	491,1	500,0	500,0
$\Delta\lambda$ (nm)	11,4	33,3	12,8
Forma	g	g+l	g
Intensidade	9,5	16,1	18,4
$\lambda_o$	513,3		514,0
$\Delta\lambda$ (nm)	23,5		17,9
Forma	g		g+l
Intensidade	11,0		12,5
$\lambda_o$	538,6	545,0	543,5
$\Delta\lambda$ (nm)	30,4	43,3	41,02
Forma	g+l	g+l	g+l
Intensidade	22,0	19,1	26,4
$\lambda_o$	570,8	581,6	580,0
$\Delta\lambda$ (nm)	24,0	30,0	25,6
Forma	g+l	g	g
Intensidade	22,0	17,6	23,5

Tabela 4: Quadro comparativo das linhas espectrais das hemoglobinas humana A, humana S e de Rana catesbeiana (espectro fotoacústico) no intervalo espectral de 300nm a 600nm, onde l indica uma curva próxima a uma Lorentziana e g uma próxima a uma Gaussiana.

Tentando agora, estabelecer bases comparativas entre os espectros fotoacústicos e de absorção óptica das amostras estudadas podemos observar que:

- i) a deconvolução espectral dos espectros fotoacústicos revelou um número maior de linhas que a deconvolução dos espectros de absorção óptica;
- ii) embora o espectro fotoacústico apresenta mais linhas de absorção, algumas linhas são comuns a ambos (o espectro fotoacústico e de absorção óptica). Como exemplo podemos citar a linha com  $\lambda_m$  próximo a 412,0nm;
- iii) quanto à forma: a linha com  $\lambda_m$  ao redor de 412,0nm, que no espectro de absorção óptica se aproxima de uma Lorentziana para todas as amostras estudadas no espectro fotoacústico se aproxima de uma Gaussiana para Hb A e Hb S e como uma superposição das duas formas para Hb Rana. A linha em torno de 350nm se apresenta como uma Gaussiana em ambos os espectros para a Hb A.

As tabelas 5, 6 e 7 apresentam estes estudos de forma sintética.

	EFA	EAO
	$\lambda_o \sim 350\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	48,1	42,3
Forma	g	g
	$\lambda_o \sim 370\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	32,9	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 412\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	48,1	27,0
Forma	g	ℓ
	$\lambda_o \sim 450\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	16,45	
Forma	g+ℓ	
	$\lambda_o \sim 465\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	12,6	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 480\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	19,0	
Forma	g+ℓ	
	$\lambda_o \sim 495\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	11,4	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 513\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	23,5	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 540\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	30,4	28,2
Forma	g+ℓ	g
	$\lambda_o \sim 575\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	24,0	21,1
Forma	g+ℓ	ℓ

Tabela 5: Quadro comparativo entre os espectros de absorção óptica (EAO) e os espectros fotoacústicos (EFA) para a hemoglobina humana A, no intervalo espectral de 300nm a 600nm.

	EFA	EAO
	$\lambda_o \sim 350\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	20,0	47,0
Forma	g+l	l
	$\lambda_o \sim 370\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	46,6	
Forma	g+l	
	$\lambda_o \sim 412\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	36,6	30,6
Forma	g	l
	$\lambda_o \sim 450\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	15,0	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 465\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	16,6	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 480\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	16,6	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 500\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	33,3	
Forma	g+l	
	$\lambda_o \sim 545\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	43,3	42,3
Forma	g+l	l
	$\lambda_o \sim 575\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	30,0	37,5
Forma	g	g+l

Tabela 6: Quadro comparativo entre os espectros de absorção óptica (EAO) e espectros fotoacústicos (EFA) para a hemoglobina humana S no intervalo espectral de 300nm a 600nm.

	EFA	EAO
	$\lambda_o \sim 350\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	69,2	70,6
Forma	g+l	g+l
	$\lambda_o \sim 412\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	46,1	35,3
Forma	g+l	l
	$\lambda_o \sim 450\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	16,6	
Forma	g+l	
	$\lambda_o \sim 465\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	17,9	
Forma	g+l	
	$\lambda_o \sim 480\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	11,5	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 495\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	12,8	
Forma	g	
	$\lambda_o \sim 513\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	17,9	
Forma	g+l	
	$\lambda_o \sim 543\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	41,02	32,9
Forma	g+l	g
	$\lambda_o \sim 575\text{nm}$	
$\Delta\lambda$ (nm)	25,6	18,8
Forma	g	l

Tabela 7: Quadro comparativo entre os espectros fotoacústicos (EFA) e de absorção óptica (EAO) para a hemoglobina de Rana castesbeiana no intervalo espectral de 300nm a 600nm.

## CAPÍTULO VI

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Tem sido considerável a contribuição da espectroscopia de absorção óptica para elucidar propriedades bioquímicas da hemoglobina. Neste trabalho após revisão da bibliografia descrevemos parte desta contribuição. Até o presente, foram obtidos espectros de absorção óptica da hemoglobina em solução aquosa ( $H_2O$ ) e em solução de  $D_2O$ . O primeiro sistema foi estudado no intervalo que se inicia no ultravioleta (200nm) e vai até o infravermelho próximo (1300nm) (ANTONINI e BRUNORI, 1971). Após 1300nm, fortes bandas de absorção da água impedem a obtenção dos espectros. Utilizando no entanto, soluções de hemoglobina em  $D_2O$  foram obtidos espectros de absorção no intervalo de  $1000cm^{-1}$  a  $2500cm^{-1}$  como descrito no capítulo III da tese.

Esse trabalho se propõe a estender o conhecimento do espectro de absorção de radiação eletromagnética da hemoglobina humana A do intervalo conhecido (de 200nm a 700nm em solução aquosa e de  $1000cm^{-1}$  a  $2500cm^{-1}$  em solução de água deuterada até 40u ( $300cm^{-1}$ ). O mesmo estudo foi efetuado com hemoglobina humana do tipo SS e de Rana catesbeiana. A impossibilidade de realizar o estudo de absorção com soluções aquosas a partir de 1300nm nos levou a encapsular a hemoglobina em células de KBr de alta qualidade óptica. Como um teste a mais na compatibilidade de nossos experimentos com as células de KBr, realizamos também um estudo da absorção de hemoglobina no intervalo de 200nm a 700nm, comparando os respectivos espectros de absorção. Dessa forma, os espectros de Hb A, Hb S e Hb de Rana catesbeiana foram obtidos no intervalo de 200nm a 40u. Obtivemos também, a

título de complementação do nosso estudo, os espectros fotoacústicos no intervalo de 300nm a 600nm, espectros estes que se revelaram de grande sensibilidade.

Uma vez obtidos os dados fundamentais, passamos a considerar a caracterização das linhas espectrais em termos de frequências de absorção, forma e largura de linha espectral, tratando essas características de forma quantitativa. Determinamos as formas das linhas espectrais de forma quantitativa utilizando modelos de linhas Lorentziano e Gaussiano. Nossa conclusão é que a maioria das linhas apresentam-se como convoluções das formas Gaussiana e Lorentziana. Determinamos as larguras de linha à meia altura do pico e suas frequências de pico (ou ressonância), após deconvoluirmos todo o espectro. Podemos afirmar que, no melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho em espectroscopia óptica de hemoglobina em que tal estudo quantitativo foi realizado.

As formas das linhas espectrais parecem indicar que hajam tanto mecanismos homogêneos quanto não-homogêneos de formação dessas linhas, embora a identificação desses mecanismos e a própria identificação da origem das linhas obtidas fuja completamente ao escopo desse trabalho. De fato, nada existe na literatura que se refira a tais mecanismos.

Evidentemente, muitas são as perspectivas para a continuação desta linha de trabalho iniciada nesta tese. Podemos destacar três áreas principais, uma das quais já foi citada acima:

- 1 - estudo da identificação da origem das linhas espectrais e da identificação dos mecanismos de formação dessas linhas;
- 2 - estender o estudo de cada linha espectral do regime não li

near utilizando lasers em sintonia com a frequência dessas linhas e de potências capazes de induzir tais efeitos; encetar estudos de absorção linear e não-linear de hemoglobinas em geral, usando lasers de pico - segundos; obter através de uma técnica diferencial a magneto-óptica da Hb em solução aquosa.

- 3 - estender os estudos considerados até aqui a outros pigmentos respiratórios propiciando um estudo comparativo entre os mesmos através de métodos de caracterização óptica e foto-acústica.



## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.J., KING, A.A., KERKBRIGHT, G.F. (1976) *The Analyst* 101: 73-85.
- AGGARWAL, S.J., RIGGS, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 2372-2383.
- ALBEN; J.O., CAUGHEY, W.S. (1968) *Biochemistry* 7: 175-183.
- ALTER, G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14960-14965.
- ALTER, G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14966-14973.
- ANTONINI, E.; ASCOLI, F.; BRUNORI, M.; CHIANCONE, E.; VERZILI, D.; MORRIS, R.J.; GIBSON, Q.H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6730-6738.
- ANTONINI, E.; BRUNORI, M. (1971) *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands*, North-Holand, London.
- BALDWIN, J.M. (1975) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 29: 225-320.
- BALDWIN, J.M. (1980) *Trends. Biochem. Sci.* 5: 224-8.
- BALDWIN, J.M.; CHOTHIA, C. (1979) *J. Mol. Biol.* 129: 175-220.
- BALDWIN, T.O. (1971) - citado por MARUYAMA et al, 1980.
- BALDWIN, T.O.; RIGGS, A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6110-6118.
- BARLOW, C.H.; MAXWELL, J.C.; WALLACE, W.J.; CAUGHEY, W.S. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 91-95.
- BOLTON, W.; PERUTZ, M.F. (1970) *Nature* 228: 551-552.
- BRAUNITZER, G.; GEHRING-MÜLLER, R.; HILSCHMANN, N.; HILSE, K. ; HOBOM, G.; RUDOLF, V.; WITTMANN-LIEBOLD, B. (1961) *Z. Physiol. Chem.* 325: 283-286.
- BRAUNITZER, G.; HILSE, K.; RUDOLF, V.; HILSCHMANN, N. (1964) *Adv. Protein Chem.* 19: 1-17.

- CAREY, P.R. (1982) Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopy, ed por B. Horecker, Academic Press, New York.
- CAUGHEY, J.M.; LUMB, W.V.; CAUGHEY, W.S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 897-903.
- CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; PERUTZ, M.F.; ROSSMANN, M.G.; NORTH, A.C.T. (1962) Proc. Royal Soc-A 265: 161-187.
- FALK, J.E. (1964) Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- FERMI, F. (1975) J. Mol. Biol. 97: 237-256.
- FUNG, L.W.M.; LIN, K.L.C.; HO C. (1975) Biochemistry 14: 3424-3430.
- GUPTA, V.P.; GUPTA, V.D.; SINGH, T.S.; GUPTA, V.N. (1984) Nat. Acad. Sci. Letters. 7: 191-195.
- GRATZER, W.B.; ALLISON, A.C. (1960) Biol. Rev. 35: 459-506.
- HAMADAK, SAKAI, V.; SHUKUYA, R.; KAZIRO, K. (1964) J. Biochem. 55: 636-642.
- HAUROWITZ, F. (1938) Z. Physiol. Chem. 254: 266-274.
- HERRICK, J. (1910) - citado por WINSLOW e ANDERSON, 1978.
- HOLWILL, M.E.; SILVESTER, N. R. (1973) Introduction to Biological Physics, John Wiley and Sons, New York.
- INGRAM, V.M. (1959) Biochem. Biophys. Acta, 36: 402.
- KONIGSBERG, W.; GUIDOTTI, G. e HILL, R. (1961) J. Biol. Chem. 236: PC 55.
- KONIGSBERG, W e HILL, R. (1962) J. Biol. Chem. 237: 3157-3162.
- KONIGSBERG, W; GOLDSTEIN, J. e HILL, R.J. (1963) J. Biol. Chem. 238: 2028-2033.

- LIMA, A.A.B. (1979) Propriedades Funcionais de Hemoglobina de Leptodactylus labyrinthicus. Tese de mestrado apresentada no Instituto de Biologia - UNICAMP.
- MANIATIS, G.M.; INGRAM, V.M. (1971) J. Cell Biol. 49: I: 372-379; II: 380-389; III: 390-404.
- MARUYAMA, T.; WATT, K.W.K.; RIGGS, A. (1980) J. Biol. Chem. 255: 3285-3293.
- MANWELL, C. (1960) Ann. Rev. Physiol. 22: 191-244.
- MAXWELL, J.C.; CAUGHEY, W.S. (1976) Biochemistry 15: 388-396.
- MAXWELL, J.C.; CAUGHEY, W.S. (1978) Methods in Enzymology 54: 302-322.
- MC COY, S.; CAUGHEY, W.S. (1970) Biochemistry 9: 2387-2393.
- MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.P. (1965) J. Mol. Biol. 12: 88-118.
- MURRELL, J.N.; KETTLE, S.F.A.; TEDDER, J.M. (1978) The Chemical Bond, John Wiley and Sons, Chichester.
- MUIRHEAD, H.; GREER, J. (1970) Nature 228: 516-519.
- MUIRHEAD, H.; PERUTZ, M.F. (1963) Nature 199: 633-638.
- NAKAMOTO, K. (1962) Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 2<sup>o</sup> ed, Wiley Interscience, New York.
- NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. (1981) Blood 58: 1057-1068.
- PANTELL, R.H.; PUTHOFF, H.E. (1969) Fundamentals of Quantum Electronics, John Wiley and Sons, New York.
- PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. (1949) Science 110: 543-548.
- PAULING, L. e CORYELL, C.D. (1936) Proc.Natl. Acad. Sci. 22:210-216.

- PERUSSI, J.R. (1983) Interação de Radicais Nitróxidos com a Molécula de Hemoglobina: um estudo por RPE. Tese de Mestrado, Departamento de Química e Física Molecular, USP - São Carlos.
- PERUTZ, M.F. (1964) *Scientific American* 211: 64-76.
- PERUTZ, M.F. (1965) *J. Mol. Biol.* 13: 646-668.
- PERUTZ, M.F. (1969) *The Harsey Lectures* 63: 213-261.
- PERUTZ, M.F. (1970) *Nature* 228: 726-734.
- PERUTZ, M.F. (1976) *Br. Med. Bull.* 32: 195-208.
- PERUTZ, M.F. (1978) *Scientific American* 239: 68-86.
- PERUTZ, M.F. (1980) *Proc. R. Soc. London B* 208: 135-162.
- PERUTZ, M.F.; BOLTON, W.; DIAMOND, R.; MUIRHEAD, H e WATSON, H. C. (1964) *Nature* 203: 687-690.
- PERUTZ, M.F.; KENDREW, J.C. e WATSON, H.C. (1965) *J. Mol. Biol.* 13: 669-678.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M. e GOAMAN, L.C.G. (1968) *Nature* 219: 131-139.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.G.; MATHEWS, F.S.; MC GANDY, E.L. e WEBB, L.E. (1968) *Nature* 219: 29-32.
- PERUTZ, M.F.; ROSSMANN, M.G.; DULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G. e NORTH, A.C.T. (1960) *Nature* 185: 416-422.
- RIGGS, A. (1951) *J. Gen. Physiol.* 35: 23-40.
- ROSENCWAIG, A. (1978) *Adv. Elect. Elect. Phys.* 46: 207-311.
- ROSENCWAIG, A. (1980) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 31-54.
- ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. (1976) *J. Appl. Phys.* 47: 64-69.
- RUBIN, N.M.; CHANGEUX, J.P. (1966) *J. Mol. Biol.* 21: 265-274.

- STRYER, L. (1979) Bioquímica, Editorial Reverté S.A, Barcelona.
- SULLIVAN, B. (1974) Chemical Zoology 9: 77-122.
- TAM, L.T.; GRAY, G.P.; RIGGS, A.F. (1986) J. Biol. Chem. 261: 8290-8294.
- TOWNES, C.H.; SCHAWLOW, A.L. (1955) Microwave Spectroscopy, Mc. Graw-Hill Book Company, New York.
- TRADER, C.D.; FRIEDEN, E. (1966) J. Biol. Chem. 241: 357-366.
- WANG, J.H.; NAKAHARA, A.; FLEISCHER, G.B. (1958) J. Am. Chem.Soc. 80: 1109-1113.
- WATT, K.W.K.; MARUYAMA, T.; RIGGS, A. (1980) J. Biol. Chem. 255: 3294-3301-
- WATT, K.W.K.; RIGGS, A. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5934-5944.
- WINSLOW, R.M. e ANDERSON, W.F. (1978) em The Metabolic Basis of Inherited Disease, editado por STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J. B. e FREDRICKSON, D.S., 4<sup>a</sup> edição Mc-Graw Hill, New York.
- WYMAN, J. (1963) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28: 483-489.