

INVESTIGAÇÃO DE INTERAÇÕES HIPERFINAS EM EDTA PELA TÉCNICA DE CORRELAÇÃO ANGULAR GAMA-GAMA PERTURBADA.

Antonio Acleto Amaral, Andréia dos Santos Silva, Artur Wilson Carbonari, André Luis Lapolli

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CRPq, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, quimicasa@gmail.com

Resumo- O conhecimento do comportamento das biomoléculas é de fundamental importância para a compreensão dos fenômenos em sistemas biológicos que se evidenciam através da observação da estrutura das biomoléculas (sítios ativos) e da dinâmica de interação local. Este trabalho utiliza a técnica de Correlação Angular Perturbada (PAC) que permitiu a obtenção dos parâmetros hiperfinos na molécula de EDTA (ligante) ligada aos núcleos de prova ^{111}Cd e ^{181}Ta , em solução de pH 11,5 e pH 4,3 respectivamente. Nestas condições, para o EDTA-Cd verificou-se: $\lambda=11,96(7)$ MHz, $\nu_q=2,57(177)$ MHz, $\eta=0$ a 295 K e $\lambda=1,91(16)$ MHz, $\nu_q=317,65(1627)$ MHz, $\eta=0,27(6)$ a 77 K. Para o composto EDTA-Ta verificou-se: $\nu_q=434,73$ (2395) MHz; $\eta=0,89(16)$ a 295 K e $\nu_q=609,96(1058)$ MHz; $\eta=0,56(2)$ a 77 K sem a evidencia de difusão rotacional. Os resultados foram considerados adequados para realização de futuras medidas.

Palavras-chave: PAC, estruturas, biomoléculas, interações hiperfinas, EDTA.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra

Introdução

Um dos problemas chave na bioquímica, por exemplo, das metaloproteínas é a compreensão de como a função da proteína está relacionada à estrutura, dinâmica e a posição de ligação do metal. As questões fundamentais são: Como a posição de ligação do íon metálico em uma enzima muda durante a catálise? Como os processos dinâmicos afetam o mecanismo de reação? Como a estrutura em torno do sítio de um íon metálico ligado depende do estado de redox? Como duas proteínas redox mutuamente os seus estados redox? Como estas reações influenciam no processo imunológico e genético? Qual a importância do conhecimento na dinâmica destas ligações considerando-se o processo terapêutico?

Estas questões se referem diretamente ao mecanismo da enzima e a interação intermolecular (proteína - proteína ou célula - proteína) no metabolismo e, desta forma, no entendimento dos elementos centrais dos processos fundamentais da vida. Entre as inúmeras técnicas que estudam tais problemas há a técnica de correlação angular γ - γ perturbada (PAC) que investiga tais fenômenos baseada na investigação das interações hiperfinas eletromagnéticas (HEMMINGSEN, et al., 2004).

As interações hiperfinas fornecem informações sobre a vizinhança atômica ao redor de um átomo de prova numa escala nanométrica por meio de interações entre os momentos do núcleo deste átomo e as cargas e spins da sua vizinhança. A técnica PAC consiste na observação da perturbação, devido às interações hiperfinas, do estado intermediário de um núcleo radioativo de um átomo que ocupa uma determinada posição dentro de uma molécula ou numa estrutura

cristalina, núcleo este que decai emitindo duas radiações- γ sucessivas. A partir da medida destas interações é possível obter informações sobre a estrutura e da distribuição de cargas em torno deste núcleo. Em sistemas biológicos as aplicações da técnica de PAC estão voltadas para o estudo do comportamento da interação de quadrupolo nuclear (NQI) devido à especificidade do ambiente biológico (LEIPERT, et al., 1968; BUTZ,1992).

Desta forma, espectroscopia de PAC tem mostrado ser uma ferramenta muito útil no estudo de biomoléculas, e não existe no Brasil nenhum grupo que a utilize neste tipo de aplicação. Assim, diante da importância de todos os aspectos acima descritos e dos avanços biotecnológicos, constantes, observa-se a relevância no desenvolvimento projetos visando a aplicação desta técnica para o estudo das estruturas dos sítios de ligação das biomoléculas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é realizar o estudo sistemático da estabilidade da ligação do EDTA com os núcleos de prova ^{111}In e ^{181}Hf em ambientes com potenciais ácidos diferentes visando investigar, futuramente, ligações, em ponte, com biomoléculas para sondagem de suas estruturas.

Materiais e Método

Para a realização da primeira etapa dos experimentos foi utilizada como amostra uma solução de Etilenodiaminotetraacetato de sódio ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Foram preparadas duas soluções: uma com pH 11,5 e outra com pH 4,3.

A solução de pH 11,5 foi preparada diluindo-se 450 mg de EDTA em 15 mL de água destilada e adicionada solução de hidróxido de sódio 0,4

mol/L até a completa dissolução do EDTA. Depois foi completado o volume de 25 mL com água destilada resultando em um pH 11,5 a 25°C. Em seguida acrescentou-se InCl_3 , que é a ponta de prova. O núcleo de prova utilizado foi o ^{111}Cd , produto do decaimento por captura eletrônica do núcleo-pai ^{111}In , que é obtido pela irradiação da ^{109}Ag com deuteron em um acelerador ciclotron. Após a separação química dos átomos de In radioativos da matriz de prata, uma solução de cloreto de índio livre de carregador é obtida com uma concentração extremamente baixa de ^{111}In . Desta forma, a composição final da amostra utilizada para medidas de PAC foi: Solução de EDTA 48 μl + 1 μl – InCl_3 .

A solução de pH 4,3 foi preparada diluindo-se 450 mg de EDTA em 15 mL de água destilada e adicionada solução de hidróxido de sódio 0,4 mol/L até a completa dissolução do EDTA. Posteriormente foi completado o volume de 25 mL com água destilada resultando em um pH 4,3 a 25°C. Em seguida acrescentou-se a ponta de prova de Hf (dissolvida em ácido HF). O núcleo de prova utilizado foi o ^{181}Ta , produto do decaimento β^- ^{181}Hf , meia-vida de 42 dias, que por sua vez é produzido por irradiação com neutrons térmicos do isótopo ^{180}Hf do háfnio natural. A solução final composta com Háfnio ficou: Solução de EDTA 48 μl + 1 μl – Hf.

As medidas de PAC foram feitas utilizando o espectrômetro de quatro detectores cintiladores de BaF_2 , ilustrado na figura 1.

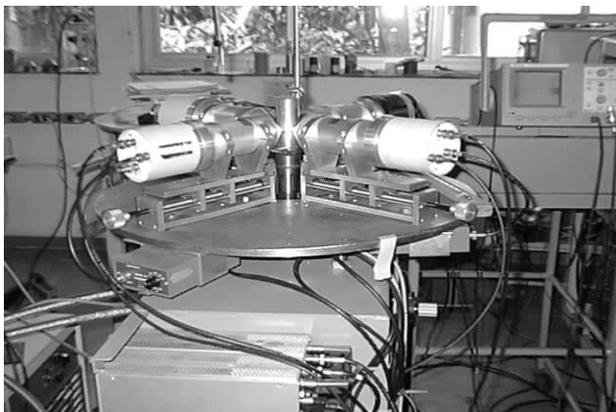


Figura 1. Espectrômetro de PAC formado com quatro detectores cônicos de BaF_2 .

Os 12 espectros de coincidências $W(\theta,t)$ acumulados no multicanal em cada medida PAC foram tratados por um programa de computador que gerou uma curva de $A_{22}G_{22}(t)$, dada por uma combinação dos espectros $W(\theta,t)$:

$$A_{22}G_{22}(t) = 2 \frac{C(180^\circ, t) - C(90^\circ, t)}{C(180^\circ, t) + 2C(90^\circ, t)}$$

onde,

$$C(180^\circ, t) = \sqrt[8]{\prod_{i=1}^8 W_i(180^\circ, t)} \quad \text{e}$$

$$C(90^\circ, t) = \sqrt[4]{\prod_{i=1}^4 W_i(90^\circ, t)}$$

sendo $W_i(\theta, t)$ os espectros de coincidências para as diversas combinações de detectores nos ângulos $\theta = 90^\circ, 180^\circ$ subtraídos os efeitos devidos a eventos de coincidências acidentais $W_A(t)$: $W_i(\theta, t) = W_i(\theta, t) - W_A(t)$.

A partir da curva de $A_{22}G_{22}(t)$ foi possível obter as frequências de transição ω_i , correspondentes ao desdobramento em energia do nível intermediário da cascata gama do núcleo de prova devido à presença do gradiente de campo elétrico originado pela vizinhança eletrônica (KARLSSON, et al., 1965).

As medidas de PAC com biomoléculas são realizadas em solução, condição na qual sofrem o efeito da difusão rotacional que é representada pelo tempo de correlação rotacional τ_{CR} , que descreve a mobilidade de uma molécula numa solução. Este tempo depende da viscosidade ξ , da temperatura absoluta T e do volume da molécula V e é definido por $\tau_{CR} = V \cdot \xi / (k_B T)$, onde k_B é a constante de Boltzmann (BRAGAM; POUND, 1953). A influência da interação dinâmica é mais forte quando $\omega_0 \tau_{CR} \approx 1$. Neste caso o efeito sobre a correlação angular será um rápido amortecimento da anisotropia como função do tempo. Há outras duas situações possíveis: (1) a flutuação da interação quadrupolar é rápida, definida por $\omega_0 \tau_{CR} \ll 1$, ou seja quando o tempo de flutuação é curto comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar caracterizada por ω_0 , o núcleo perde a coerência de fase e a função de perturbação se torna um simples decaimento exponencial, (2) no regime de flutuação da interação quadrupolar lenta, definida por $\omega_0 \tau_{CR} \gg 1$, ou seja quando o tempo de flutuação é longo comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar, o efeito sobre a correlação angular será um lento amortecimento da anisotropia. No limite $\tau_{CR} \rightarrow \infty$, a interação será puramente estática. Somente neste caso é possível determinar simultaneamente tanto ω_0 (frequência de interação quadrupolar) e η (assimetria) que são os parâmetros hiperfinos relacionados com a estrutura local do sítio do núcleo de prova na biomolécula.

Neste trabalho, foram realizadas medidas a nas amostras de EDTA-Cd e EDTA-Ta, à temperaturas ambiente e a temperatura do nitrogênio líquido 77K.

Resultados

Os resultados preliminares estão apresentados nas Figuras 2, 3, 4 e 5 onde se observam os espectros de interações hiperfinas para os núcleos de ^{111}Cd (Figuras 2 e 3) e ^{181}Ta (Figuras 4 e 5) ligados à molécula de EDTA em solução com pH 11,5 e 4,3 respectivamente a temperatura de 25°C. As amostras foram medidas à temperatura ambiente e à temperatura do nitrogênio líquido 77 K. Os espectros de coincidência foram reduzidos utilizando-se o programa TDPAC, desenvolvido no Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do IPEN e analisados pelo programa PACFIT, desenvolvido no Laboratório de Correlação Angular do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

Na Figura 2, abaixo, o resultado obtido para a frequência de difusão rotacional foi $\lambda=11,96(7)$ MHz, frequência de interação quadrupolar $\nu_q=2,57(177)$ MHz sem observação da assimetria (η).

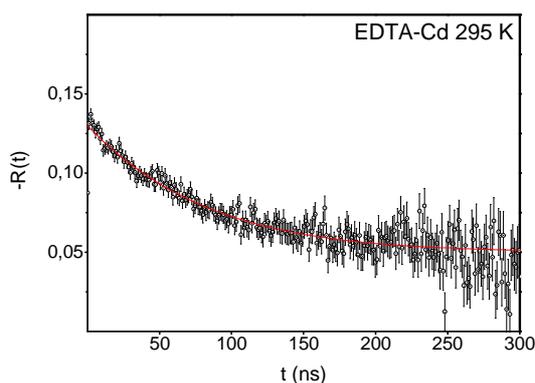


Figura 2. Espectro interação hiperfina para o EDTA com núcleo de prova ^{111}Cd a temperatura de 295K.

Para temperatura de 77 K os parâmetros calculados foram:

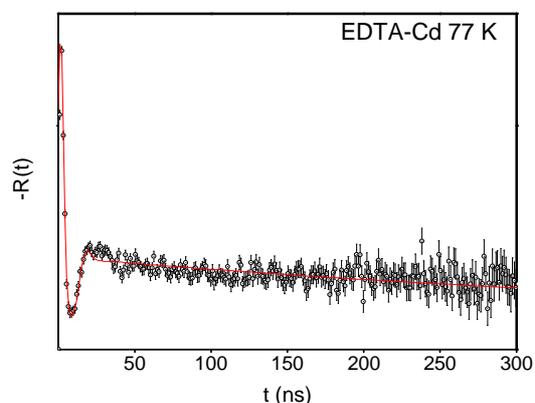


Figura 3. Espectro interação hiperfina para o EDTA com núcleo de prova ^{111}Cd a temperatura de 77K.

$\nu_q=317,65(1627)$ MHz; $\eta=0,27(6)$; $\lambda=1,91(16)$ MHz.

Já os parâmetros da interação hiperfina determinados para o EDTA-Ta foram: a 295 K; $\nu_q = 434,73(2395)$ MHz; $\eta = 0,89(16)$. A 77 K; $\nu_q = 609,96(1058)$ MHz; $\eta=0,56(2)$. Neste composto não foi observado difusão rotacional.

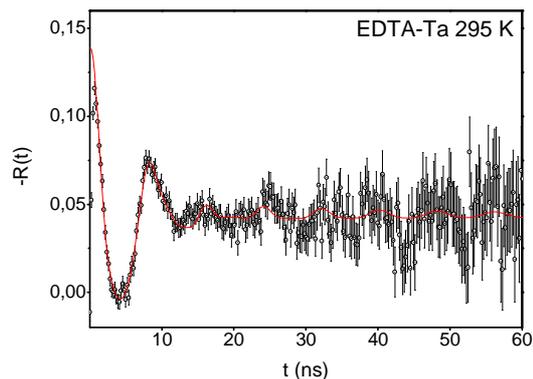


Figura 4. Espectro interação hiperfina para o EDTA com núcleo de prova ^{181}Ta a temperatura de 295K.

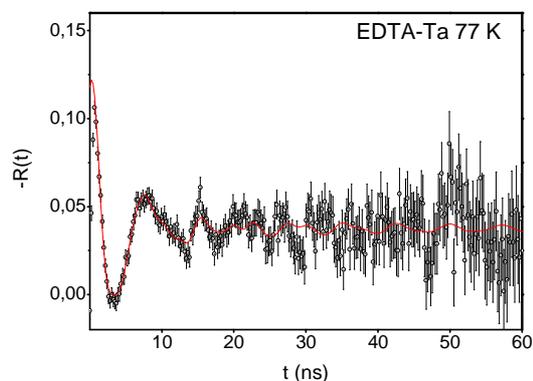


Figura 5. Espectro interação hiperfina para o EDTA com núcleo de prova ^{181}Ta a temperatura de 77K.

Discussão

Sendo o objetivo deste trabalho o estudo sistemático da ligação do núcleo de prova com a molécula de Etilenodiaminotetraacetato de sódio ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou EDTA, consideram-se os resultados apresentados apenas preliminares dando uma evidência da possível utilização desta molécula como um ligante entre o núcleo de prova e a biomolécula que se pretende estudar.

EDTA-Cd: Como observado o sistema encontra-se em solução e os resultados, Figuras 2 e 3, mostram que o núcleo de ^{111}In efetivamente se ligou ao EDTA, apresentando o espectro que

evidencia uma correlação rotacional com flutuação de tempo curto à temperatura ambiente (295 K, Figura 2). Neste caso, a frequência de difusão rotacional, frequência de interação quadrupolar e observação da assimetria denotam a total perda de coerência no espectro de correlação angular, mas efetivamente há evidência de ligação do ^{111}In à molécula de EDTA como esperado para o pH 11,5. A comprovação final desta ligação é observada à temperatura de 77 K onde o espectro (Figura 3) evidencia uma forte interação com uma fraca componente de difusão rotacional mostrada pela tendência a zero da curva no decorrer do tempo.

EDTA-Ta: Os espectros tanto a 77 K como a 295 K demonstram que não há difusão rotacional e que efetivamente o ^{181}Hf se ligou à molécula de EDTA, como esperado para o pH 4,3. Da mesma forma, observou-se um aumento da intensidade a interação devido ao aumento da interação quadrupolar no resfriamento. Além disso, observou-se uma possível ligação do ^{181}Hf em outros sítios desta molécula.

Conclusão

Este trabalho apresentou a aplicação da técnica de correlação angular perturbada para o estudo de interações hiperfinas em biomoléculas.

Especificamente foram realizadas medidas preliminares na molécula de EDTA (molécula ligante ou quelante), com os núcleos de prova ^{111}Cd e ^{181}Hf , visando futuras aplicações para o estudo de estrutura das macromoléculas (ou biomoléculas).

Para o EDTA-Cd, em solução com pH 11,5, observou-se a existência de difusão rotacional à temperatura de 297 K, e forte redução deste efeito termodinâmico à 77 K.

Já no EDTA-Ta, em solução com pH 4,3, não se verificou o efeito de difusão rotacional devido ao fato da vida média do estado intermediário ser bem menor do que o tempo de correlação.

Com base no exposto, conclui-se que esta molécula demonstra ser adequada para ser utilizada como ligante em biomoléculas na impossibilidade da ligação direta do núcleo de prova.

Para finalizar, futuramente pretende-se realizar um estudo sistemático desta molécula, com ambas as pontas de prova, visando um conhecimento detalhado de sua interação com estes núcleos.

Referências

- ABRAMGAM, A; Pound, R. V. Influence of electric and magnetic fields on angular correlations. **Phys Rev.** 92, 943-962, 1953.

- BUTZ, T. Analytic perturbation function for static interaction in perturbed angular correlations of γ -rays. **Hyperfine Interactions** 52, 189-228, 1989.

- HEMMINGSEN, L., SAS, K.N., DANIELSEN, E. Biological Applications of Perturbed Angular Correlations of γ -Ray Spectroscopy. **Chem. Rev.** 104, 4027-4061, 2004.

- KARLSSON, E.; MATTHIAS, E.; SIEGBAHN, S. **Perturbed Angular Correlation**, North-Holland, Amsterdam, 1965.

- LEIPERT, T. K; BALDESCHWIELER, J. D; SHIRLEY, D. A. Applications of gamma ray angular correlations to the study of biological macromolecules in solutions. **Nature.** 200, 907-909, 1968.