



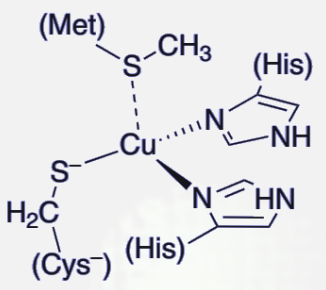
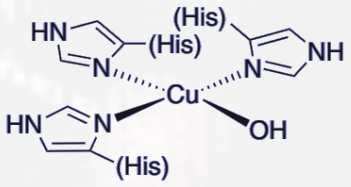
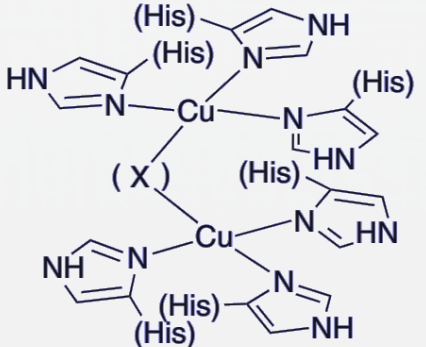
Bioinorgânica do Cobre

Dr. Tiago P. Camargo

A química Bioinorgânica do Cobre: uma alternativa ao ferro

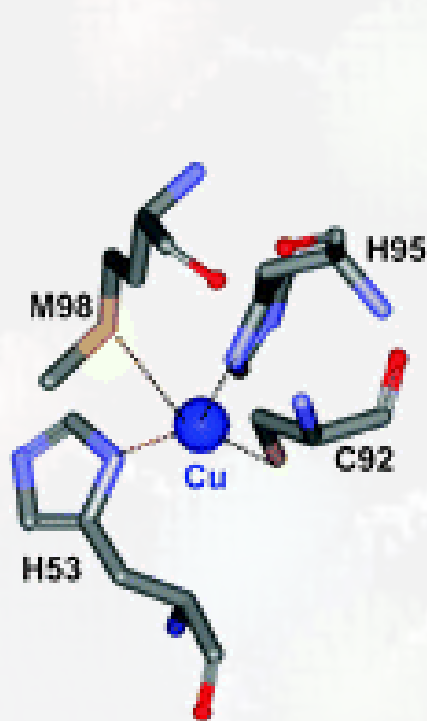
Do ponto de vista estrutural e espectroscópico, vários "tipos" de centro biológico de cobre podem ser distinguidos em proteínas, de acordo com uma convenção geralmente aceita

Table 10.3 Characteristics of "classical" copper centers in proteins.

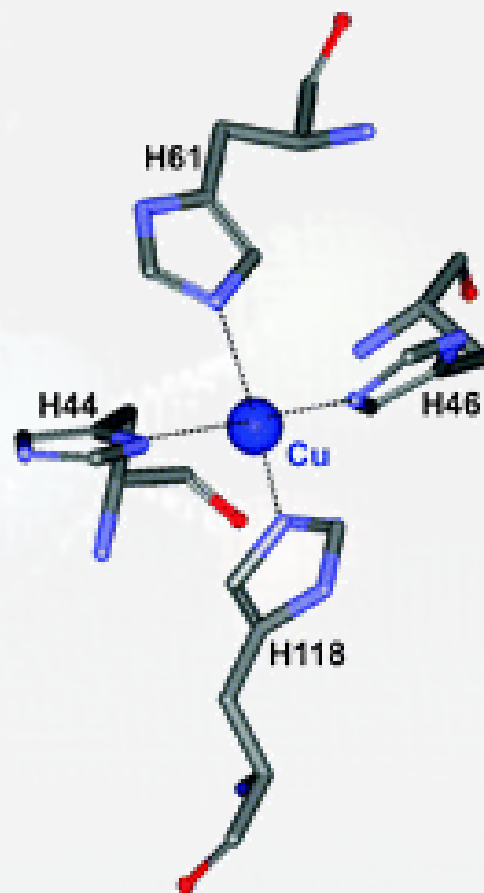
Generalized coordination geometry	Function, structure, characteristics
<p>type 1</p> 	<p>type 1: "blue" copper centers function: reversible electron transfer $\text{Cu}^{\text{II}} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}$ structure: strongly distorted, (3 + 1) coordination absorption of the copper(II) form at about 600 nm, molar extinction coefficient $\epsilon > 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LMCT transition $\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ EPR/ENDOR of the oxidized form: small $^{63,65}\text{Cu}$ hyperfine coupling and g anisotropy, interaction of the electron spin with $-\text{S}-\text{CH}_2-$; $\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{S}(\text{Cys})$ spin delocalization</p>
<p>type 2</p> 	<p>type 2: normal, "non-blue" copper function: O_2 activation from the Cu^{I} state in cooperation with organic coenzymes structure: essentially planar with weak additional coordination (Jahn–Teller effect for Cu^{II}), typically weak absorptions of Cu^{II}, $\epsilon < 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ligand–field transitions ($d \rightarrow d$) normal Cu^{II} EPR</p>
<p>type 3</p> 	<p>type 3: copper dimers function: O_2 uptake from the $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{I}}$ state structure: (bridged) dimer, $\text{Cu}-\text{Cu}$ distance about 360 pm after O_2 uptake, intense absorptions around 350 and 600 nm, $\epsilon = 20\,000$ and $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LMCT transitions $\text{O}_2^{2-} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ EPR-inactive Cu^{II} form (antiferromagnetically coupled d^9 centers)</p>

Centros de cobre tipo 2 e tipo 3 em proteínas ativadoras de O_2 :

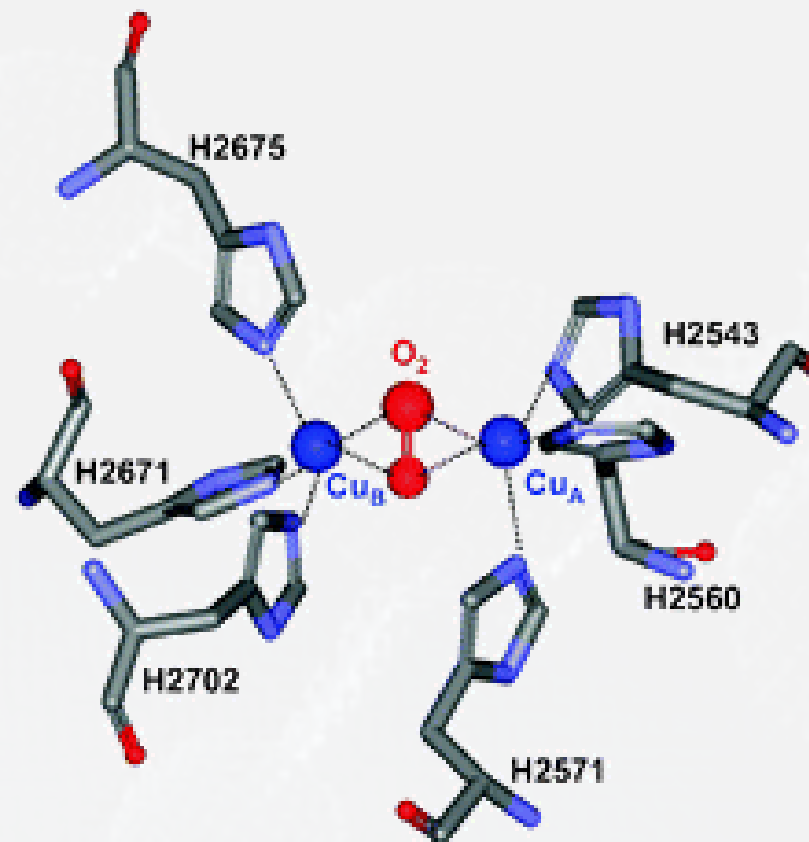
Do ponto de vista estrutural e espectroscópico, vários "tipos" de centro biológico de cobre podem ser distinguidos em proteínas, de acordo com uma convenção geralmente aceita



Type 1 copper site
(amicyanin)



Type 2 copper site
(superoxide dismutase)

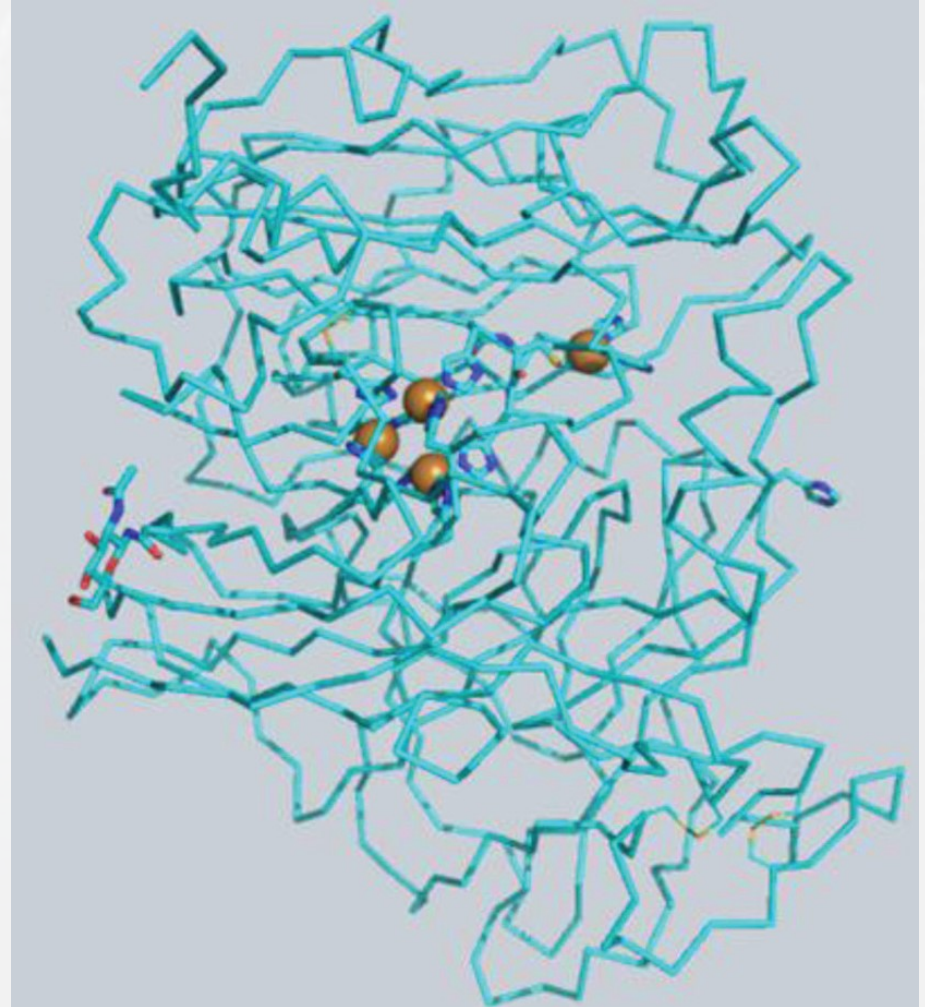


Type 3 copper site
(hemocyanin)

Proteínas de cobre como oxidases / redutases

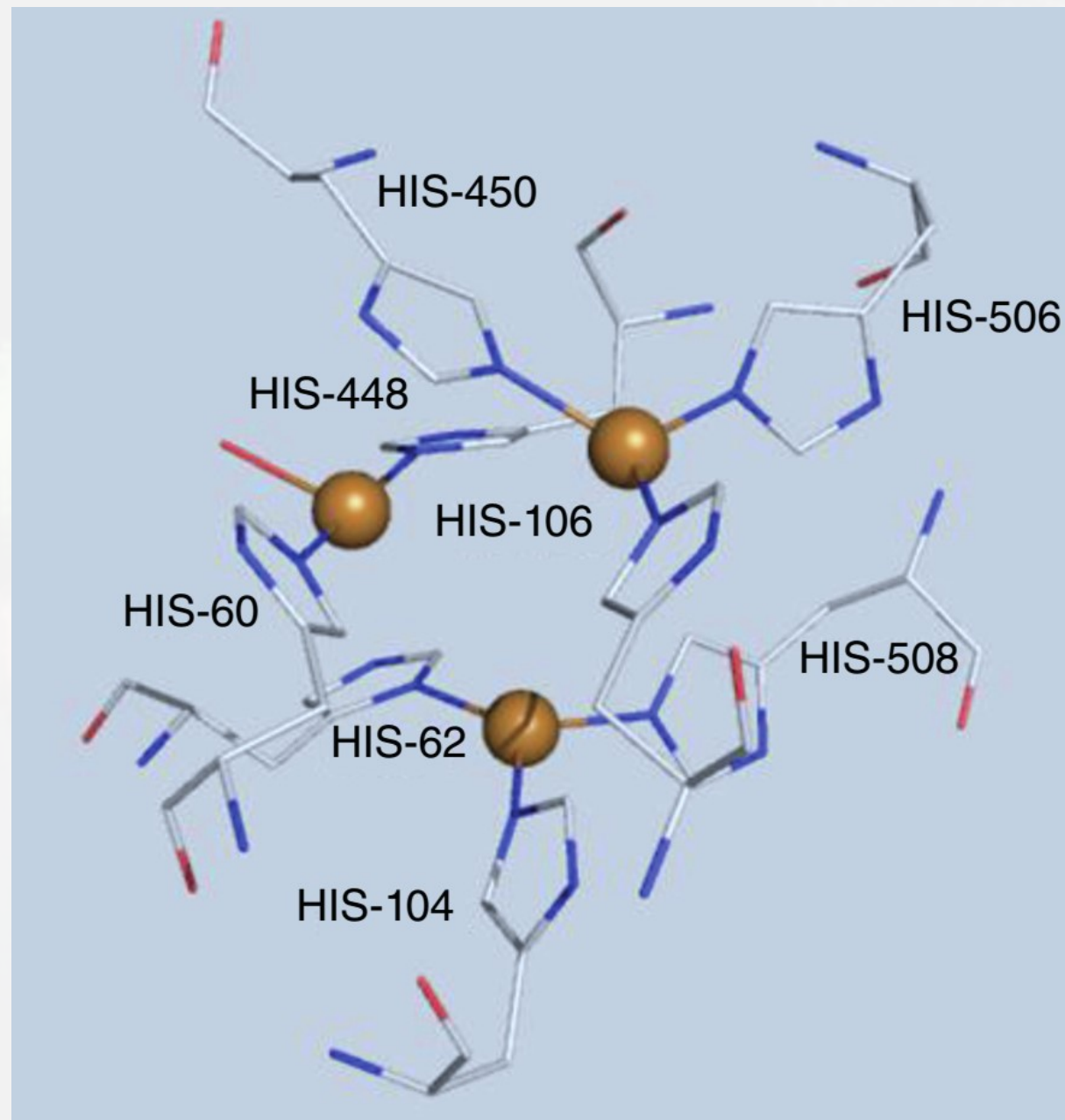
Dentre as Monoxigenases dependentes de Cu, existem várias oxidases "azuis" e "não azuis" contendo centros que convertem ambos os átomos de O_2 em H_2O ou H_2O_2 . Algumas oxidases possuem estruturas complexas e geralmente contém vários tipos de centros de cobre.

Dados estruturais para lacase e ascorbato oxidase mostram que os centros de cobre do "tipo 2" e do "tipo 3" estão tão próximos um do outro que, de fato, um trímero de cobre com novas propriedades pode ser formulado. Este arranjo parece favorecer uma redução de quatro elétrons de O_2 para dois H_2O ; em troca, quatro equivalentes de oxidação tornam-se disponíveis para os substratos polifenólicos.



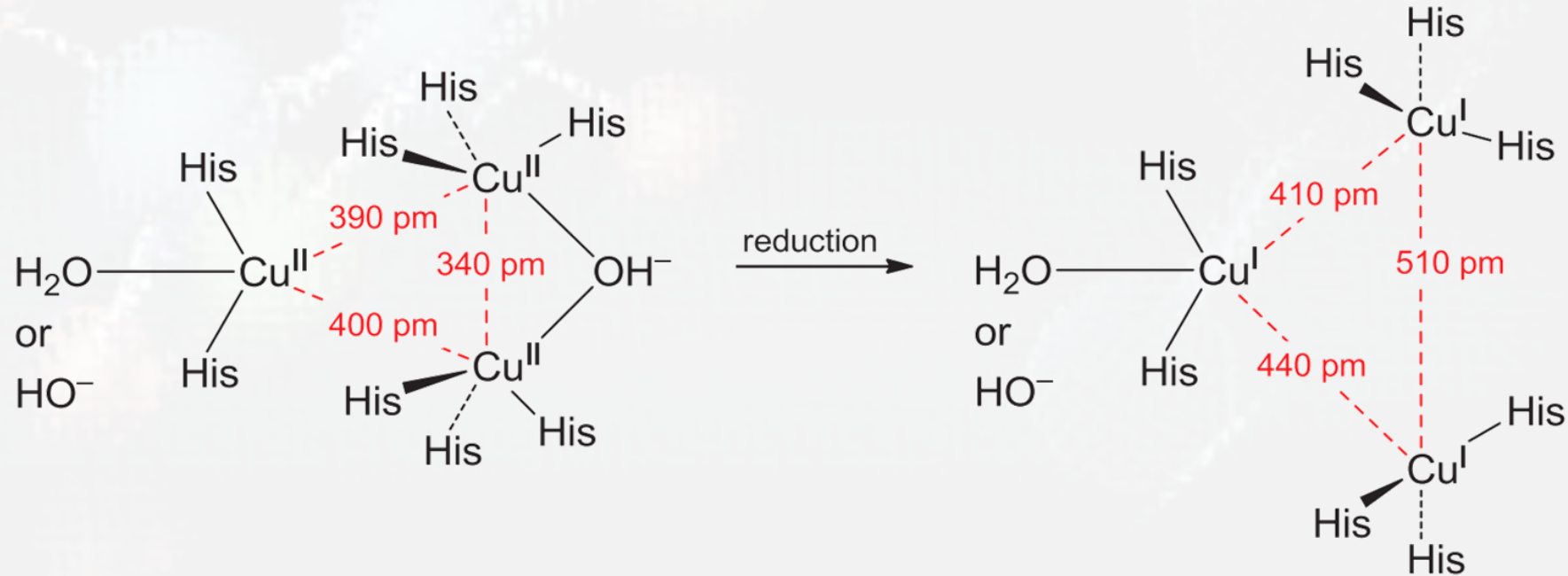
Proteínas de cobre como oxidases / redutases

A análise da estrutura cristalina da ascorbato oxidase mostra um trímero de cobre e um centro de Cu tipo 1 separado, separados por uma distância de mais de 12 Å. No trímero, dois centros de metal, cada um coordenado por três resíduos de histidina, são ligados por hidróxido dissociável, enquanto o terceiro, centro de cobre "tipo 2" coordenadamente insaturado, está ligado a dois ligantes de histidina e um OH-



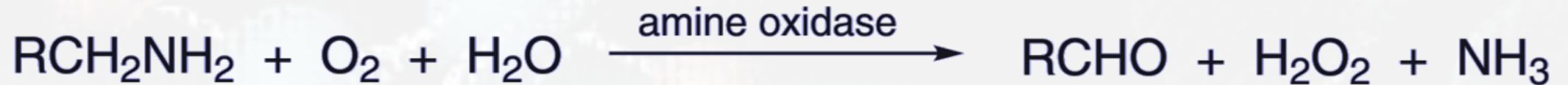
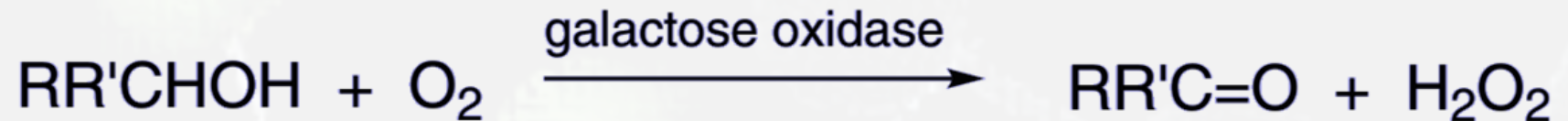
Proteínas de cobre como oxidases / redutases

Este arranjo estrutural ilustra a função de tais enzimas: a transformação do potencial de oxidação $4e^-$ do O_2 em elétrons separados, que são então passados individualmente para um local de ligação ao substrato através do centro de cobre tipo 1. No estado Cu^I totalmente reduzido, o ligante de hidróxido de ponte é dissociado, diminuindo o número de coordenação, enquanto as distâncias Cu-Cu sofrem um aumento acentuado. Na forma oxigenada, um íon hidroperóxido, HOO^- , é coordenado na forma “end on” a um dos centros de cobre tipo 3 oxidado.



Proteínas de cobre como oxidases / redutases

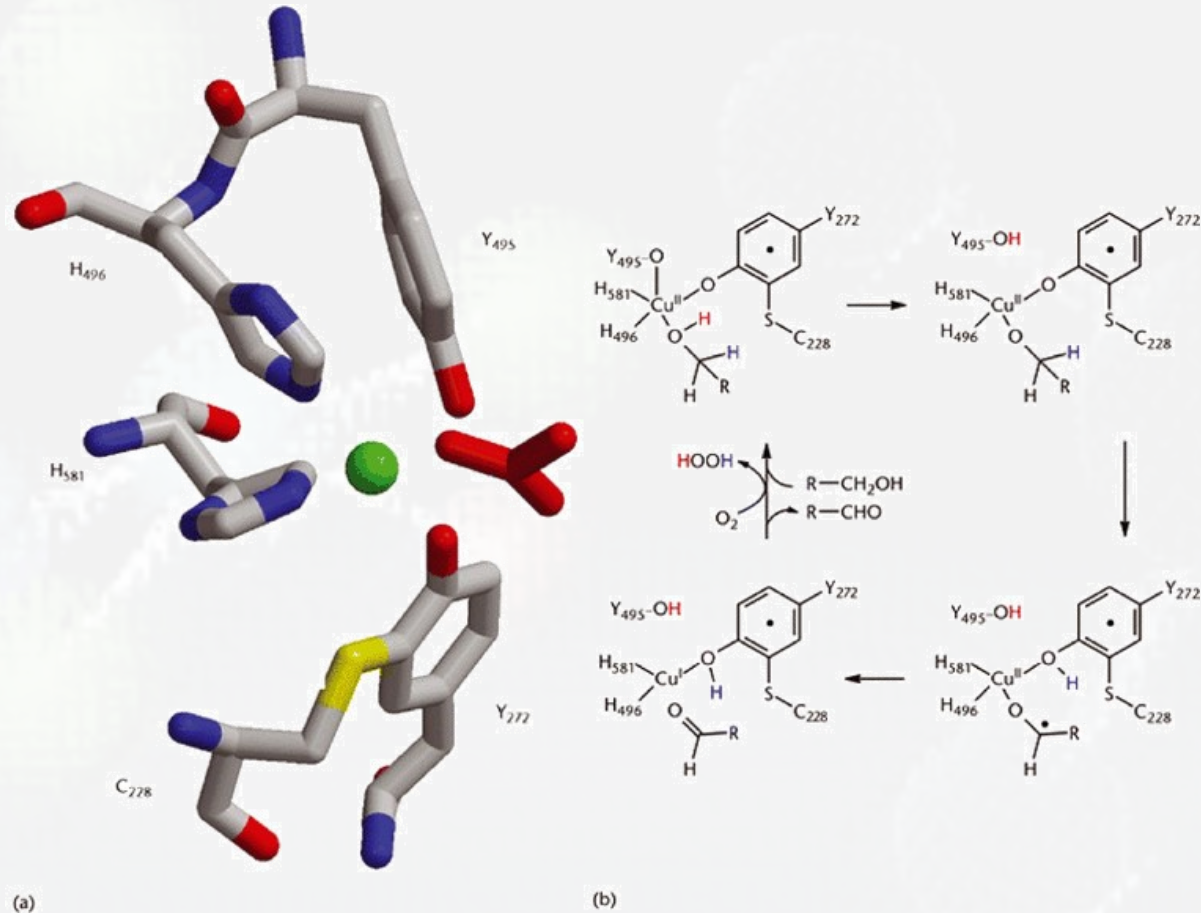
A estudos detalhados da estrutura primária revela um desenvolvimento cada vez mais complexo de proteínas de cobre relacionadas na série: plastocianina (1 Cu), ascorbato oxidase (3 Cu) e ceruloplasmina (6 Cu).



A reatividade de oxidases dependentes de cobre não azuis, como a galactose oxidase estereoespecífica e amina oxidases com cobre tipo 2 coordenado principalmente com histidina, é baseada na interação do centro de metal único (Cu^I, II) com **cofatores redox orgânicos**; o resultado geral é uma reatividade de dois elétrons, que é necessária para a transformação $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. As sugestões anteriores envolvendo uma transição $\text{Cu}^{\text{I}} / \text{Cu}^{\text{III}}$ não foram comprovadas.

Proteínas de cobre como oxidases / redutases

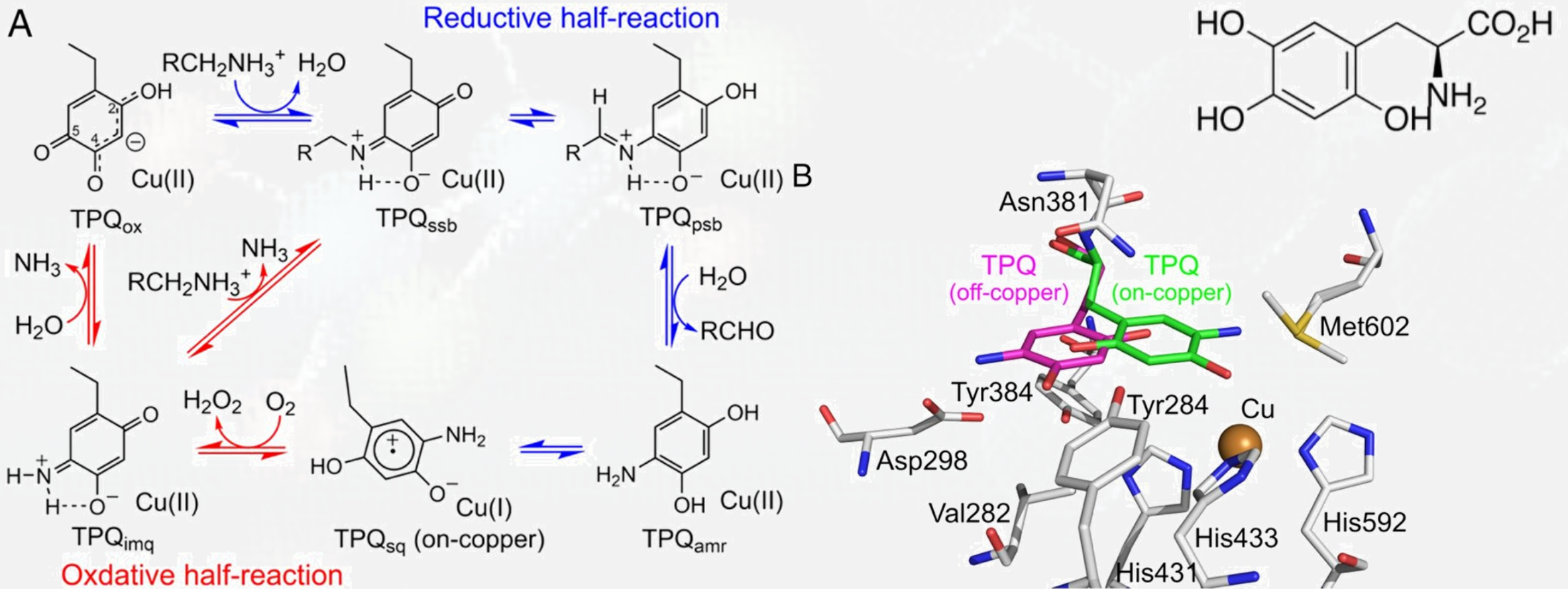
A galactose oxidase (68 kDa), isolada do fungo *Dactylium dendroides*, contém um único centro de Cu(II) em um arranjo piramidal quadrado com duas histidinas, duas tirosinas



Supõe-se que o ligante equatorial forme um radical tirosil, que em combinação com a transição $\text{Cu}^{\text{I}} / \text{Cu}^{\text{II}}$, serve para efetuar a catálise do processo de dois elétrons.

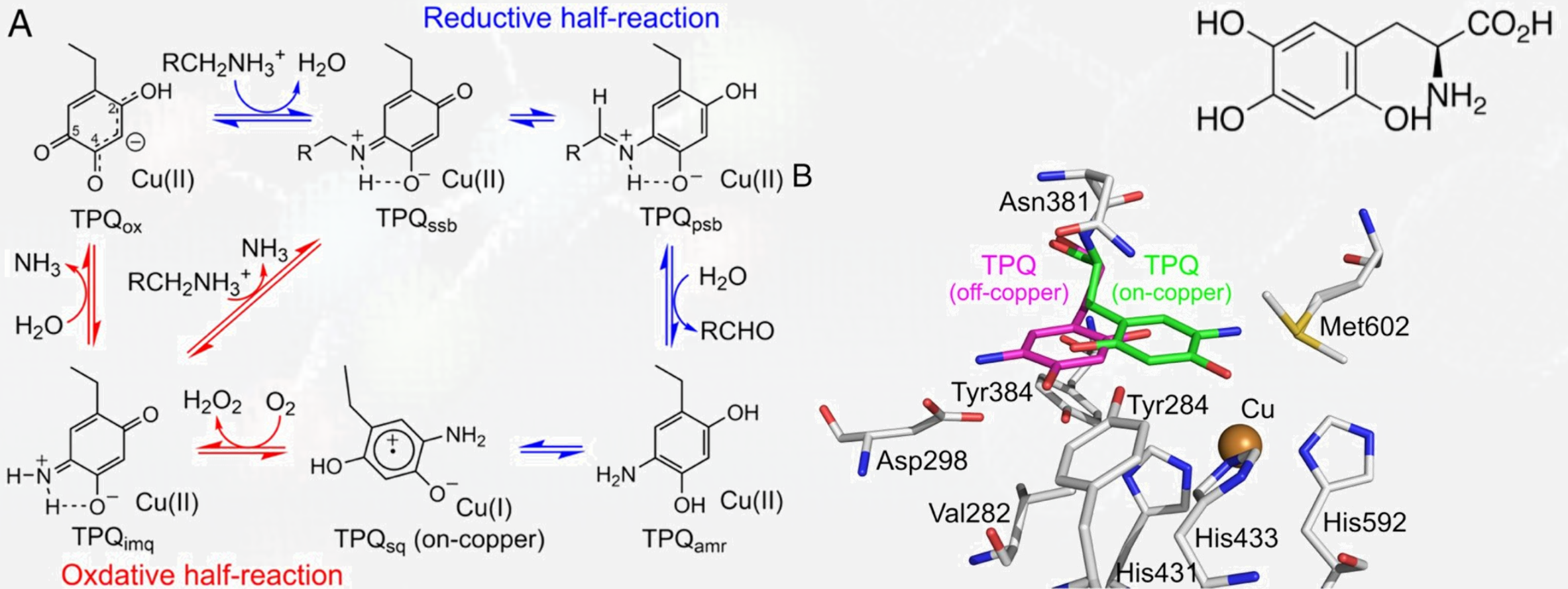
Proteínas de cobre como oxidases / redutases

Os cofatores redox orgânicos também estão presentes na amina oxidase; o sistema *o,p*-quinonoide derivado de aminoácido 6-hidroxi-dopa quinona (PAQ) foi estabelecido. Uma transferência intra-enzimática de elétrons entre as formas Cu^{II} /coenzima catecolato e Cu^{I} / coenzima semiquinona foi sugerida. As amina oxidases têm várias funções fisiológicas significativas, como no metabolismo do tecido conjuntivo, como o colágeno.



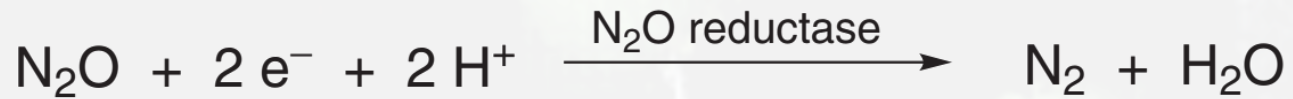
Proteínas de cobre como oxidases / redutases

Os cofatores redox orgânicos também estão presentes na amina oxidase; o sistema *o,p*-quinonoide derivado de aminoácido 6-hidroxi-dopa quinona (PAQ) foi estabelecido. Uma transferência intra-enzimática de elétrons entre as formas Cu^{II} /coenzima catecolato e Cu^{I} / coenzima semiquinona foi sugerida. As amina oxidases têm várias funções fisiológicas significativas, como no metabolismo do tecido conjuntivo, como o colágeno.

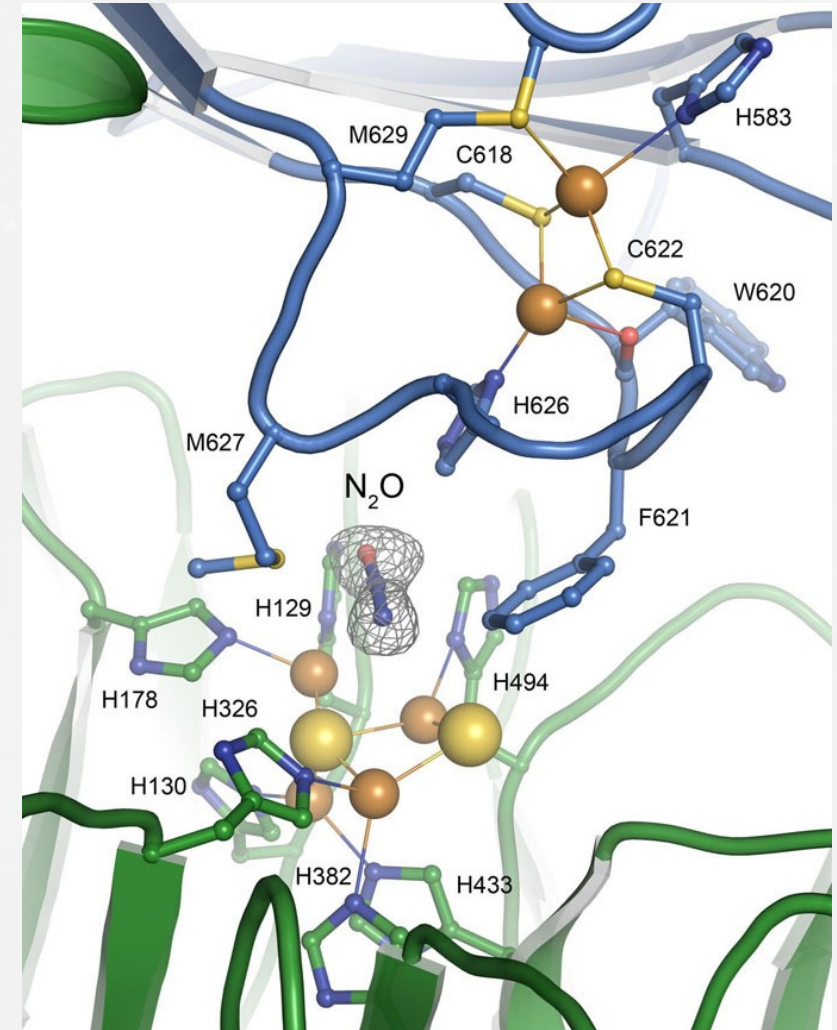


Proteínas de cobre como oxidases / redutases

Enzimas contendo cobre com propriedades espectroscópicas incomuns de seus centros metálicos foram isoladas de bactérias importantes para o ciclo global de nitrogênio, incluindo bactérias redutoras de nitrito e óxido nitroso (N₂O) e microrganismos que oxidam amônia em hidroxilamina.

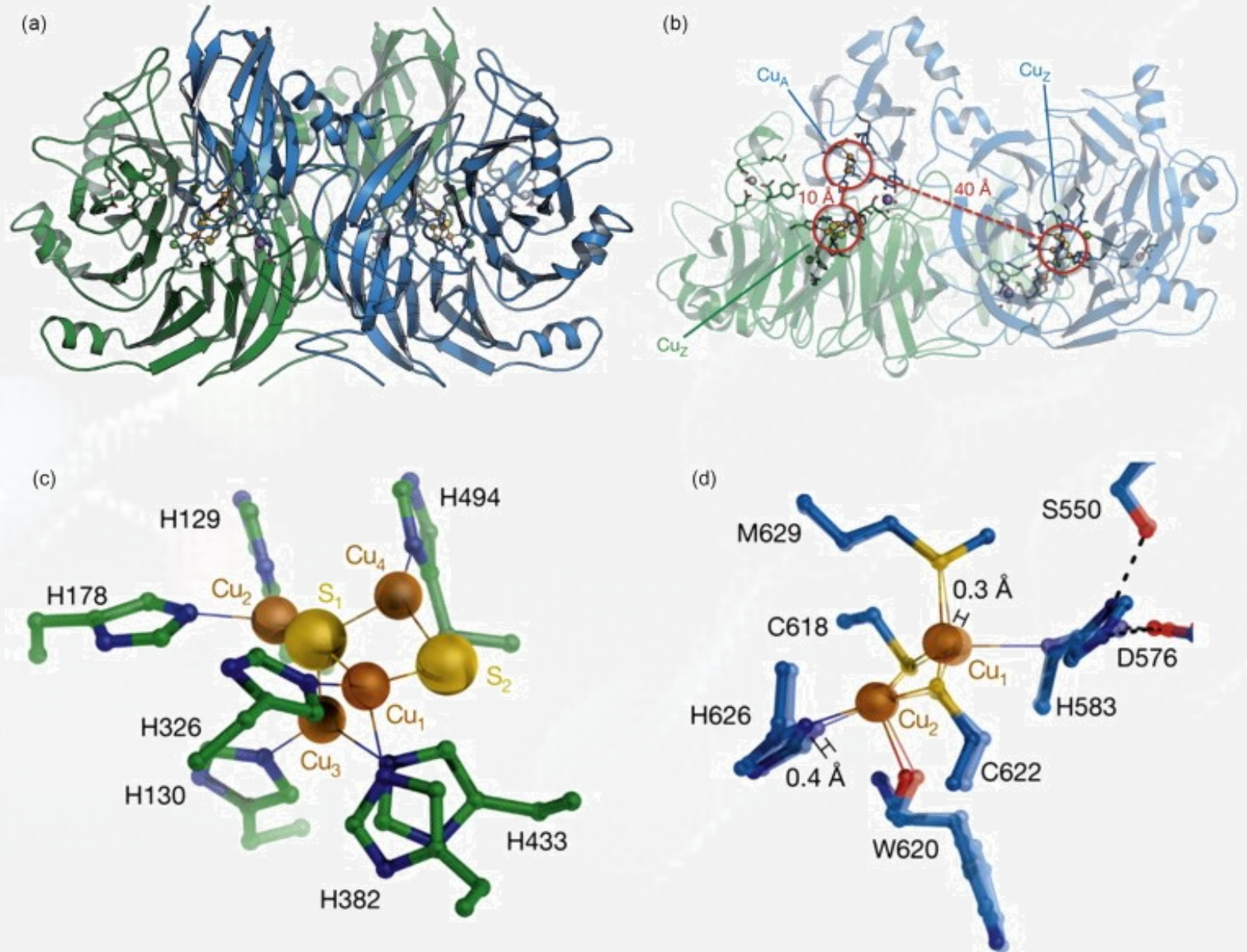


Os centros de cobre de N₂O redutase de *Pseudomonas stutzeri* incluem "CuA", apresenta um centro binuclear de valência mista totalmente deslocalizado Cu^I/Cu^{II}. Este sítio CuA com absorção em altos comprimentos de onda (redox) foi observado pela primeira vez na citocromo c oxidase. O centro "CuZ" cataliticamente ativo é um aglomerado tetranuclear de cobre [4Cu-2S] com sete ligantes de histidina e dois sulfeto íons em um arranjo de baixa simetria, o que deixa espaço para a ligação de N=N=O linear.



Proteínas de cobre como oxidases / redutases

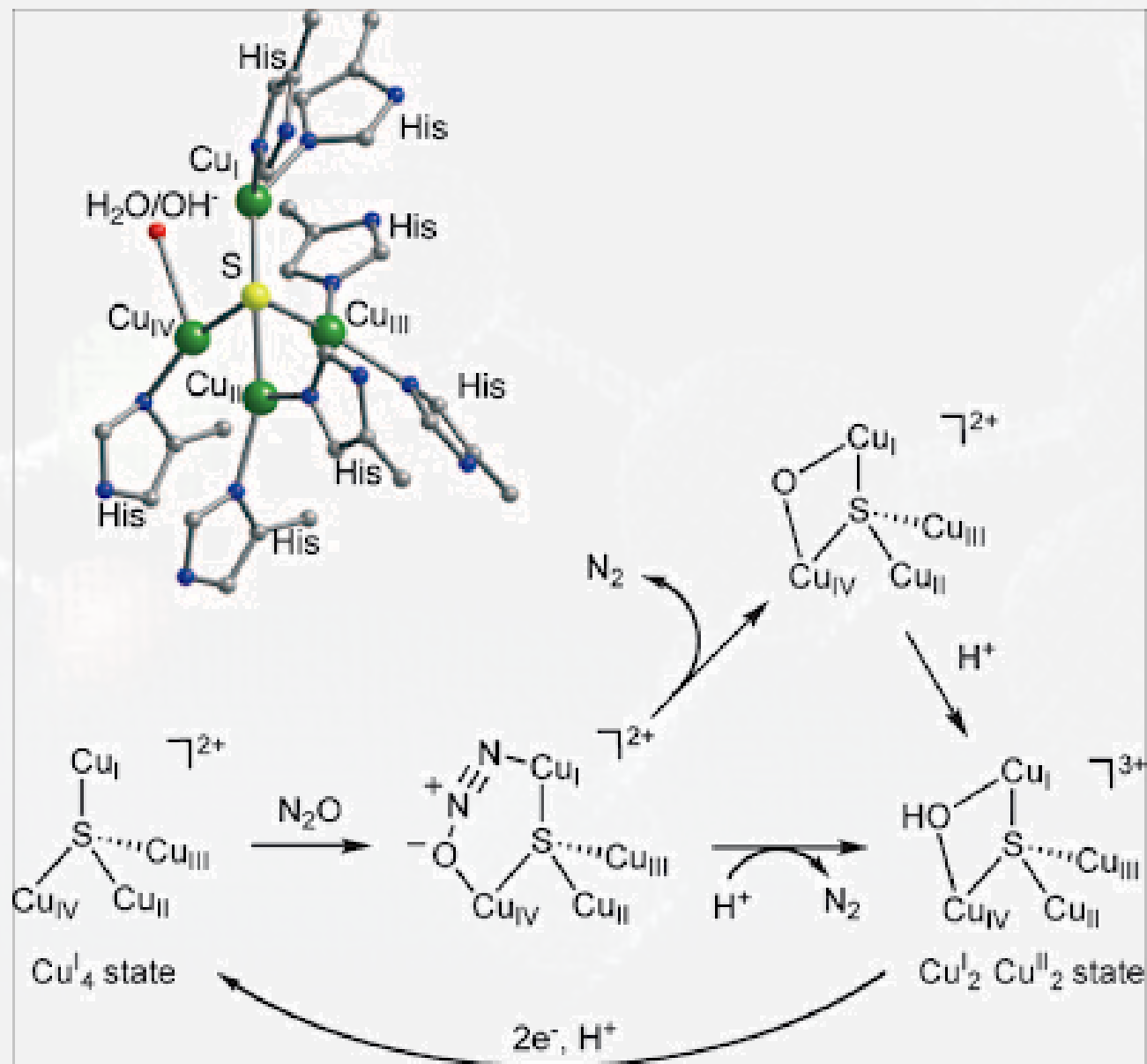
Os centros de cobre de N_2O redutase de *Pseudomonas stutzeri* incluem "CuA", apresenta um centro binuclear de valência mista totalmente deslocalizado Cu^I/Cu^{II} . Este sítio CuA com absorção em altos comprimentos de onda (redox) foi observado pela primeira vez na citocromo c oxidase. O centro "CuZ" cataliticamente ativo é um aglomerado tetranuclear de cobre $[4Cu-2S]$ com sete ligantes de histidina e dois sulfeto íons em um arranjo de baixa simetria, o que deixa espaço para a ligação de $N=N=O$ linear.



Proteínas de cobre como oxidases / redutases

Uma estrutura de complexo Cu^I-NO foi postulada como intermediária na desnitrificação na nitrito redutase bacteriana contendo cobre em N₂O e N₂. Somente seguindo esta sugestão os complexos de nitrosil simples de Cu^I foram sintetizados e estruturalmente caracterizados.

Proposta mecanística: N₂O



Proteínas de cobre como oxidases / redutases

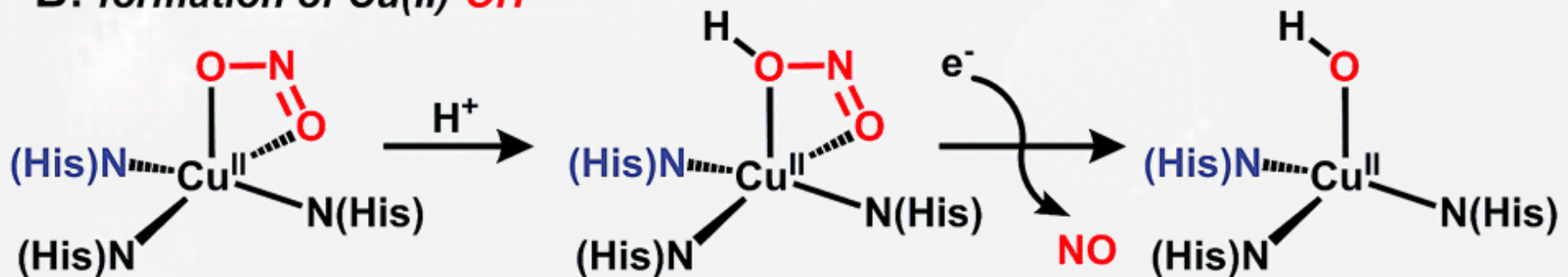
Uma estrutura de complexo $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-NO}$ foi postulada como intermediária na desnitrificação na nitrito redutase bacteriana contendo cobre em N_2O e N_2 . Somente seguindo esta sugestão os complexos de nitrosil simples de Cu^{I} foram sintetizados e estruturalmente caracterizados.

Proposta mecanística: NO_2^{1-}

A: formation of Cu-NO

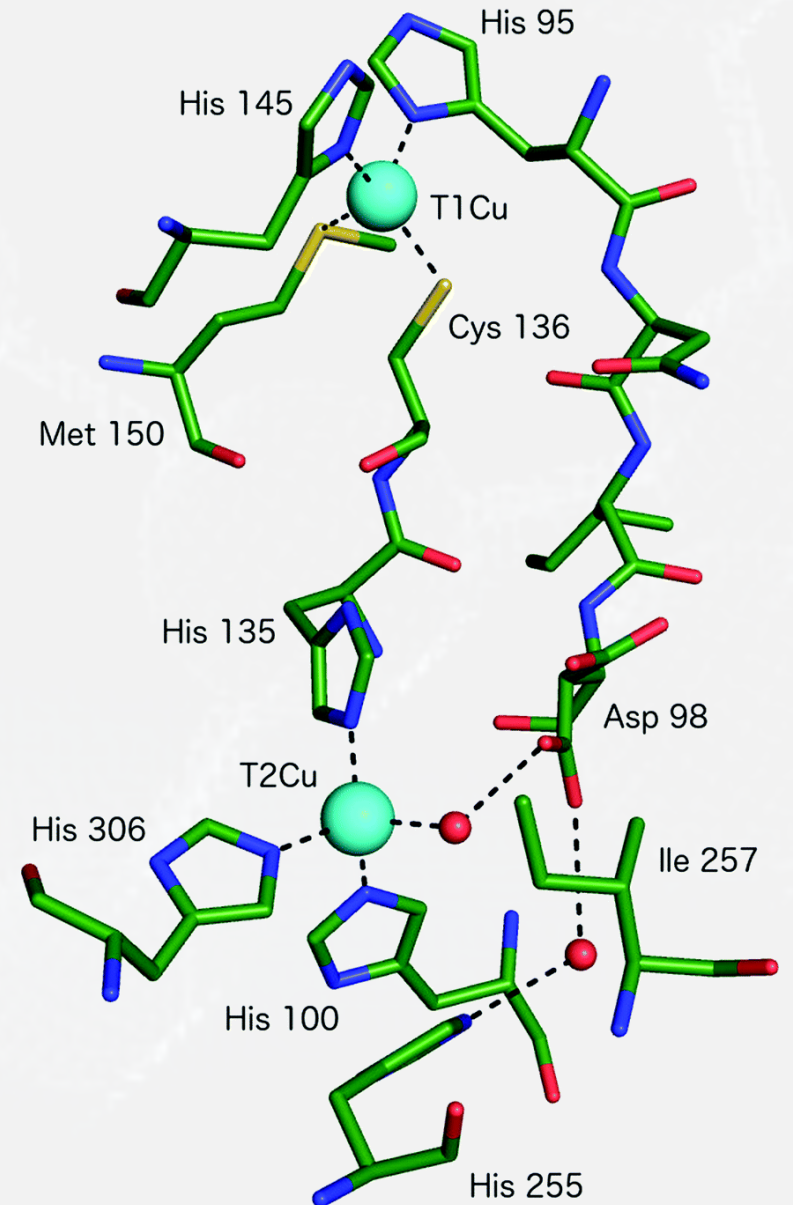
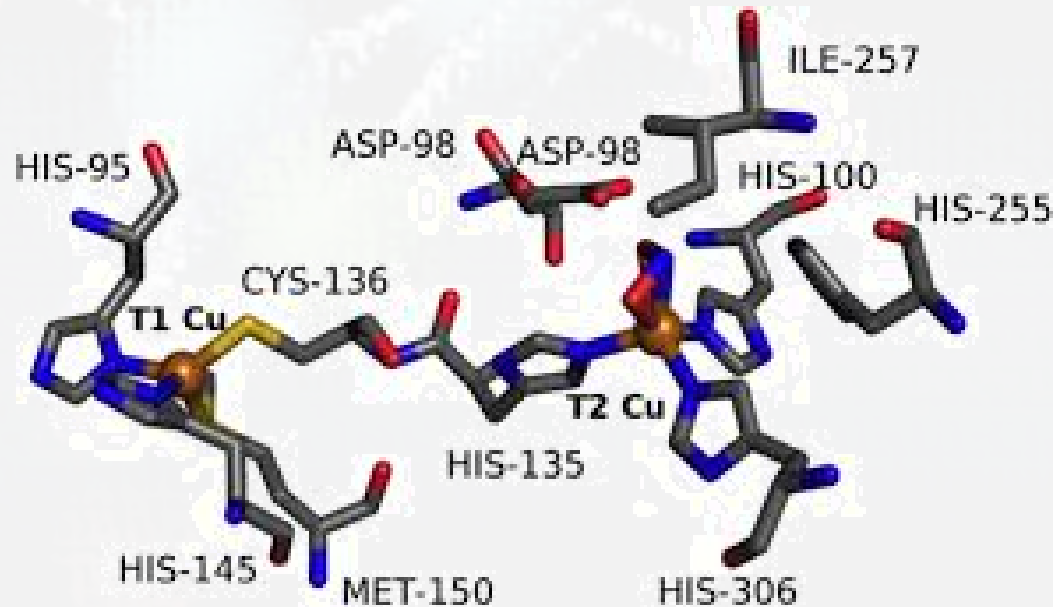


B: formation of Cu(II)-OH



Proteínas de cobre como oxidases / redutases

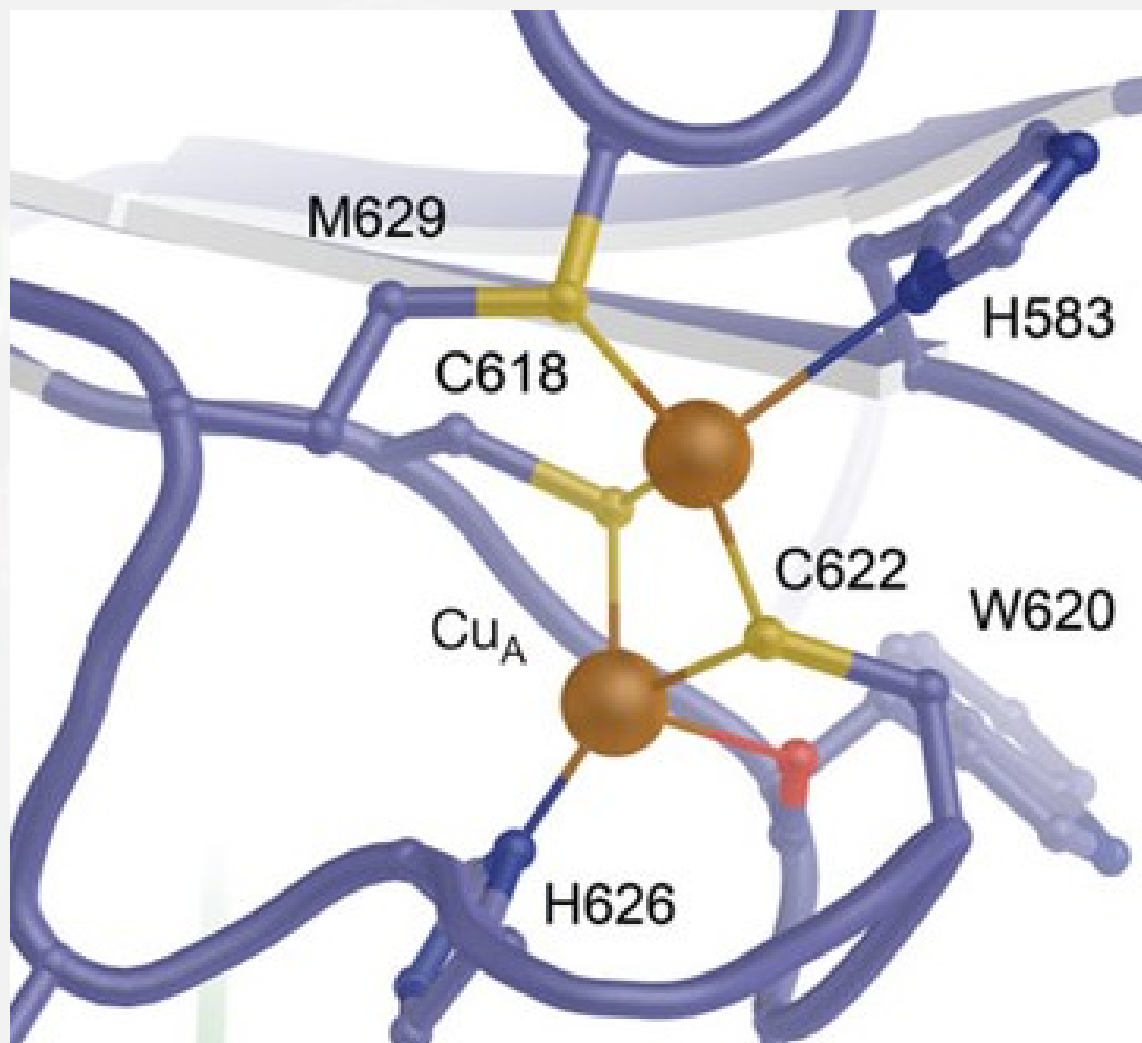
A análise da estrutura cristalina da nitrito redutase de *chromobacter cycloclastas* mostra uma enzima trimérica com centros de cobre 3×2, centros de cobre tipo 1 e tipo 2 com aproximadamente 12,5 Å de distância. Devido à sua geometria de coordenação tetraédrica incomum, os centros de cobre pseudo tipo 2 individuais são considerados os locais de ligação e redução para NO_2^- ; eles estão localizados na parte inferior dos canais cheios de solvente e cada centro é ligado a ligantes de histidina de diferentes subunidades de proteínas



Outros Tipos de Cobre Biológico.

Centros binucleares de Cobre A (Cu_A): são encontrados na citocromo c oxidase e na redutase do óxido nitroso. Os dois átomos de cobre são coordenados por duas histidinas, uma metionina, um esqueleto proteico carbonil, oxigênio e dois resíduos de cisteína em ponte.

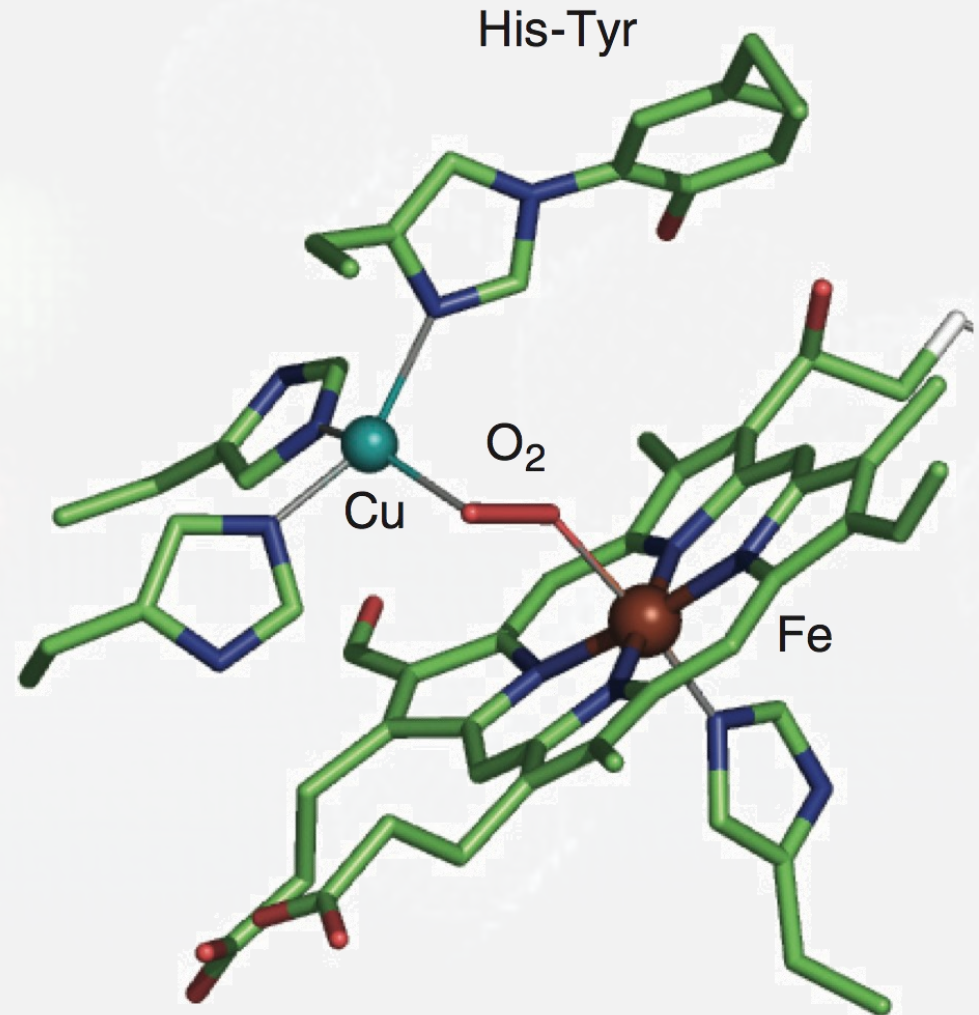
Centro de Cu_A na N_2O redutase



Outros Tipos de Cobre Biológico.

Centros de Cobre B (Cu_B): são encontrados na citocromo c oxidase. O átomo de cobre é coordenado por três histidinas na geometria piramidal trigonal.

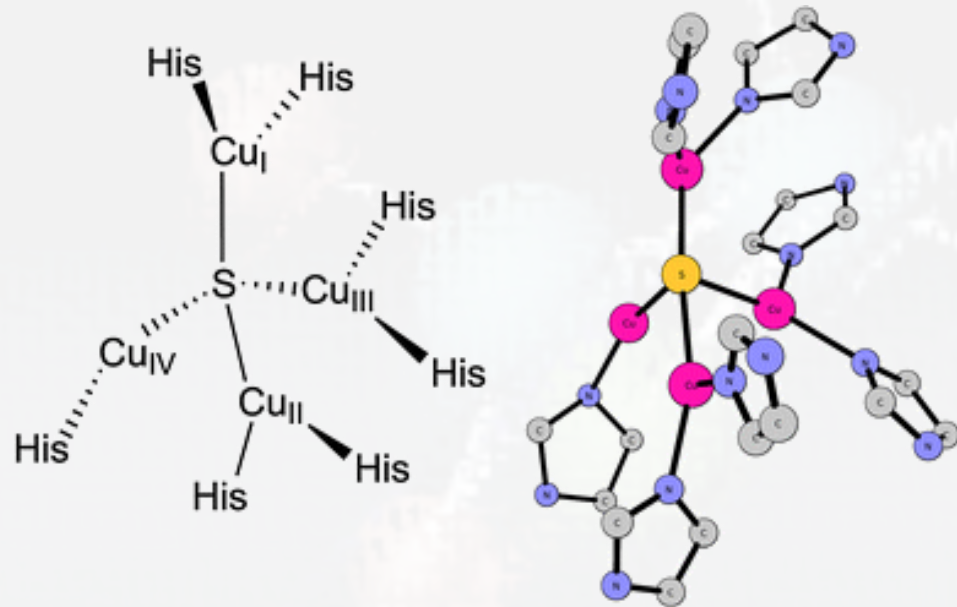
Centro de Cu_B na Citocromo C oxidase:



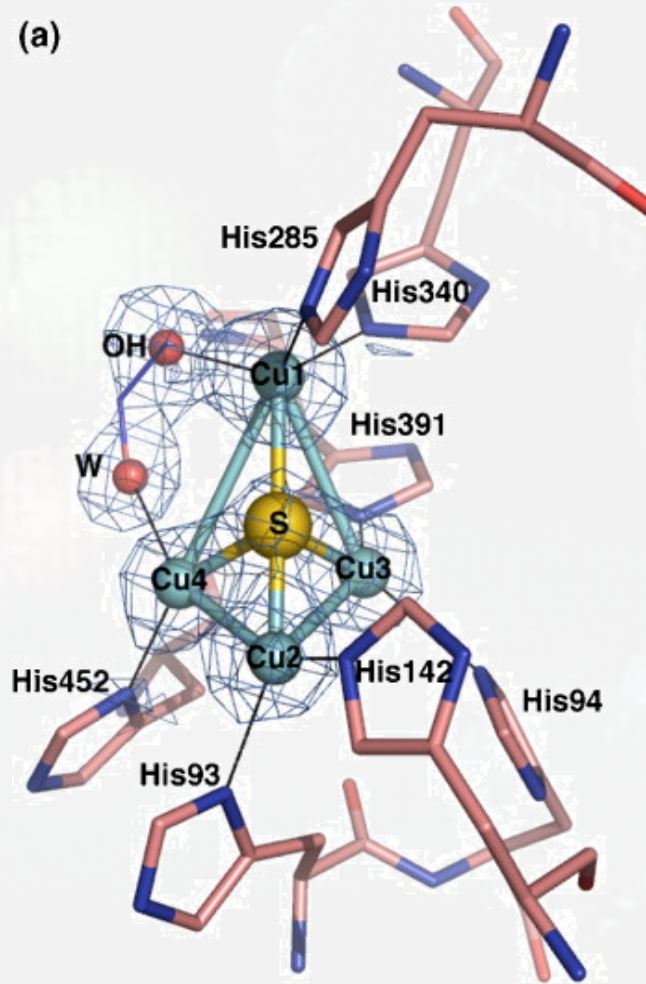
Outros Tipos de Cobre Biológico.

Centros tetranucleares de Cobre Z (Cu_Z): é encontrado na redutase de óxido nitroso. Os quatro átomos de cobre são coordenados por sete resíduos de histidina e ligados por um átomo de enxofre.

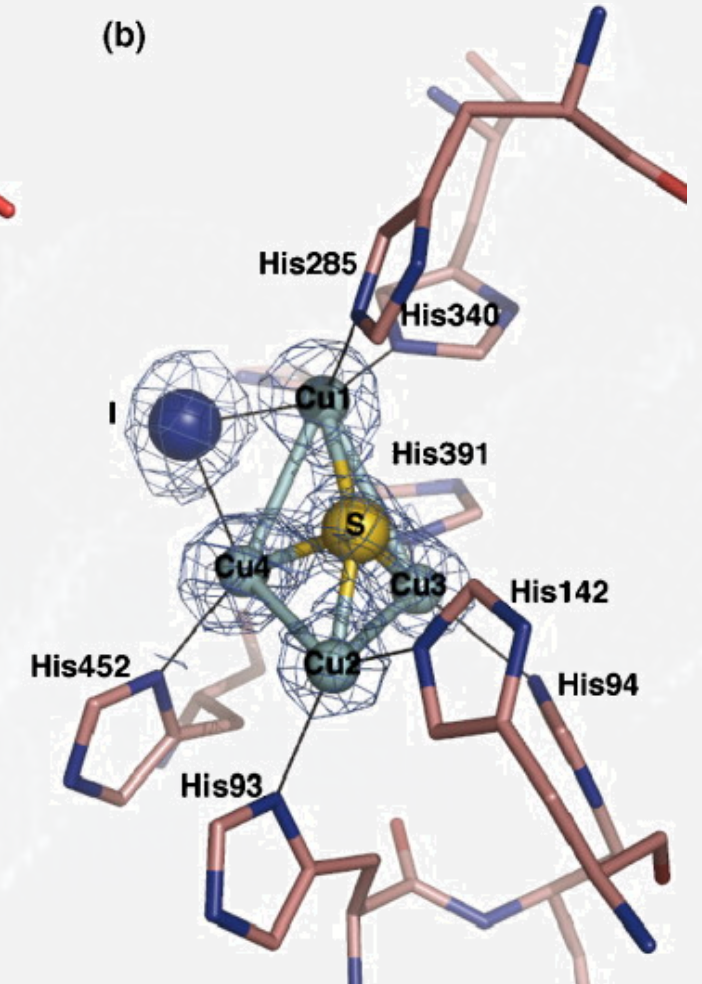
Centro de Cu_Z na N_2O Redutase



(a)



(b)

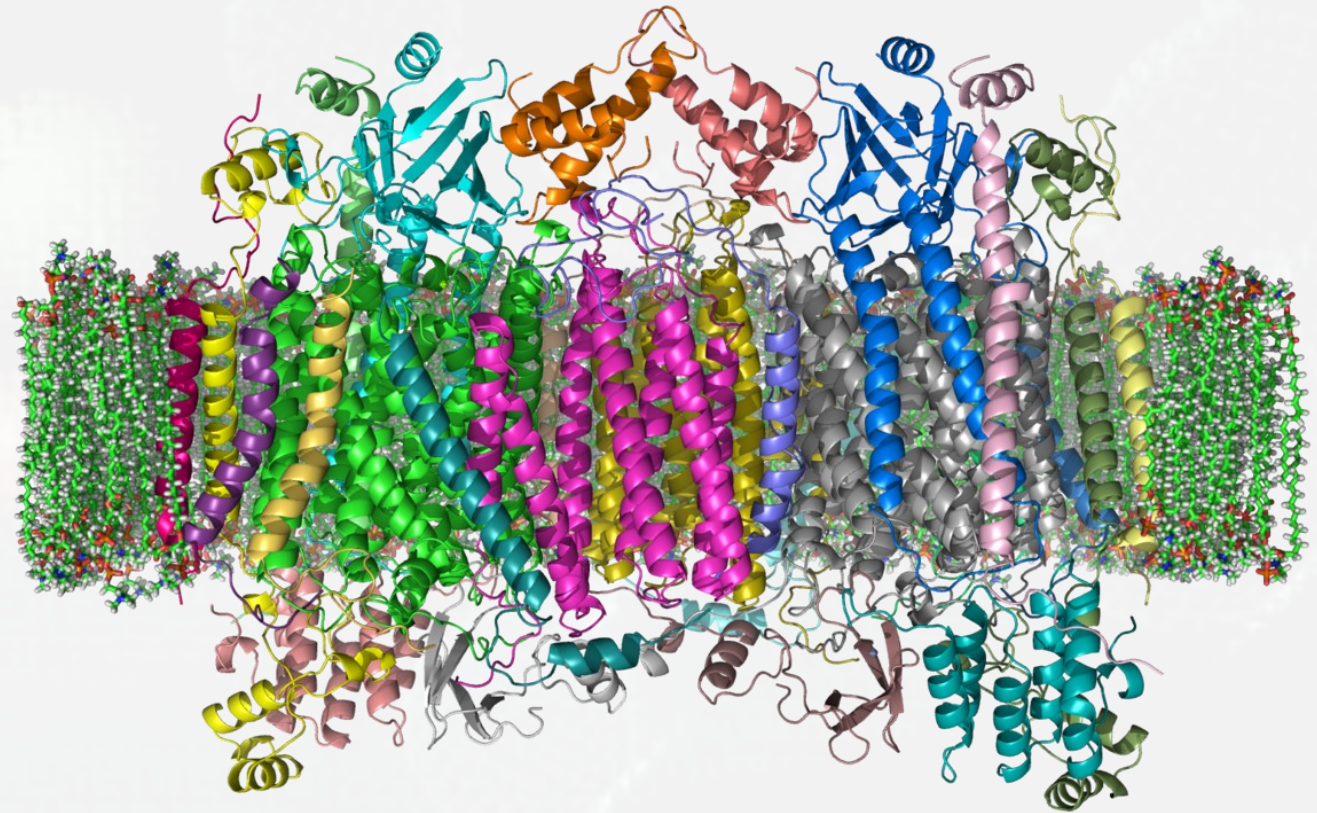


Citocromo c Oxidase

A citocromo c oxidase, o “Atmungsferment” (enzima respiratória) de Otto Warburg (Prêmio Nobel de Medicina de 1931), é um complexo de proteína de membrana e, como tal, o local da última fosforilação na cadeia respiratória.

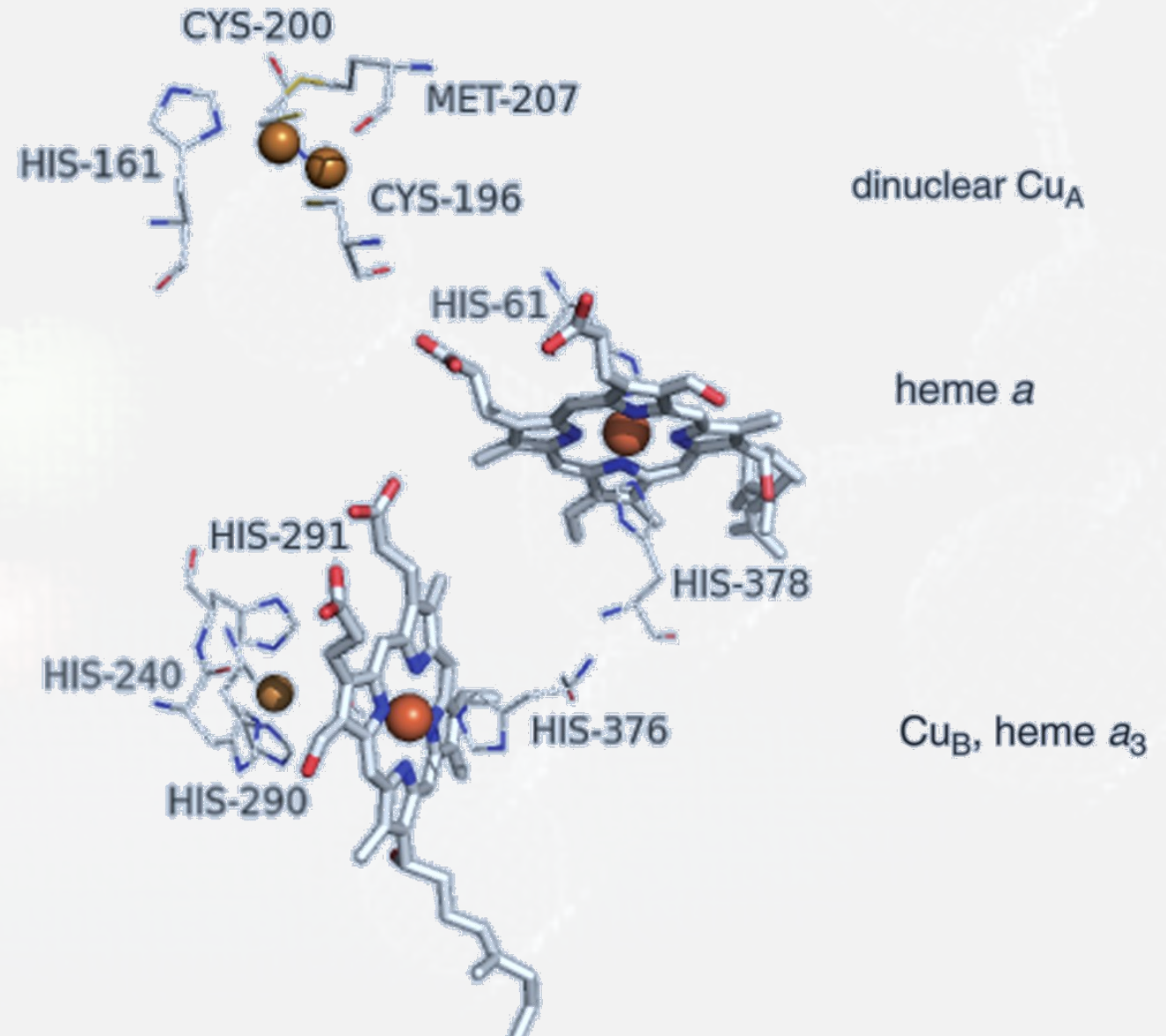
Atua na transformação de O_2 e H^+ em água. Como sistema consumidor de O_2 , representa a contrapartida dos centros contendo Mn produtores de oxigênio na membrana fotossintética.

Por estas enzimas serem funcionais e estáveis apenas dentro das membranas, resulta na necessidade de uma separação controlada e^- e H^+ durante as reações redox. A caracterização estrutural desses sistemas muito complexos ainda não é totalmente conhecido



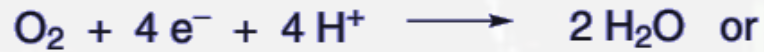
Citocromo c Oxidase

A citocromo c oxidase está ligada ao periplasma e ao complexo bc1 por meio do citocromo c. É uma das metaloproteínas mais importantes, contendo até 13 subunidades diferentes (> 100 kDa). Até 1985, o conteúdo de metal de dois Cu e dois (heme) Fe era assumido; entretanto, análises refinadas de enzimas isoladas de microrganismos confirmaram um total de 3 centros de cobre, 2 átomos de ferro heme, um Zn^{2+} e um Mg^{2+} por monômero de proteína.

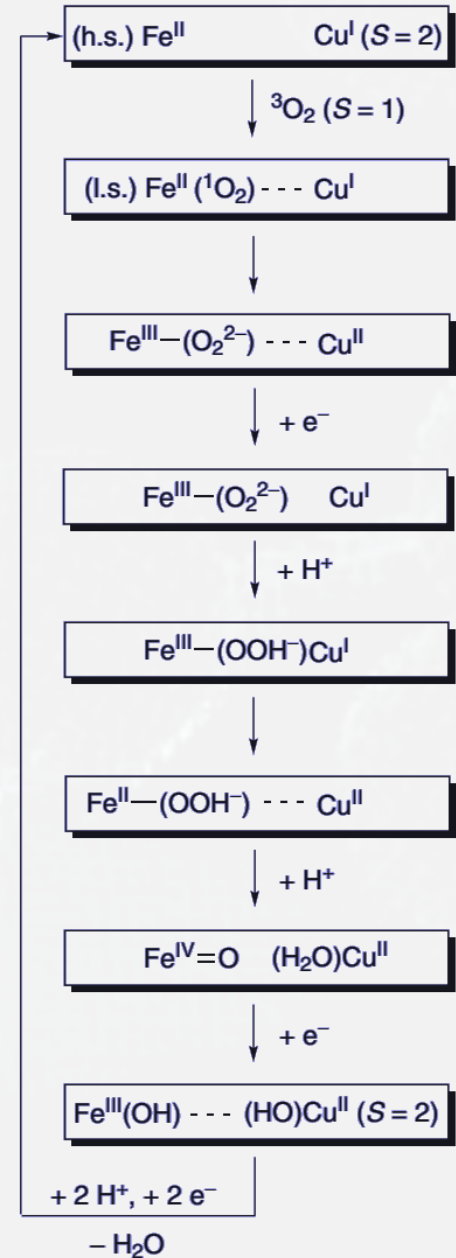
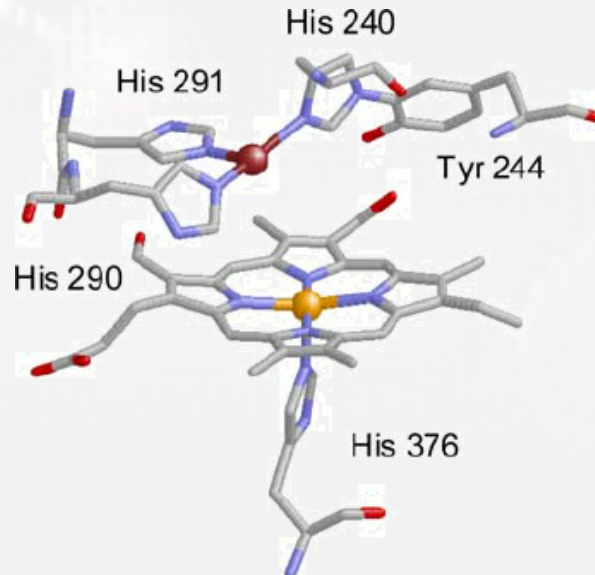


Citocromo c Oxidase

O citocromo a e o Cu_A têm principalmente funções de transferência de elétrons em potenciais fisiologicamente elevados; como a oxidação de quatro elétrons de duas moléculas de H_2O , o mecanismo da redução de 4 prótons/quatro elétrons do O_2 pode ser formulado como um processo em etapas.

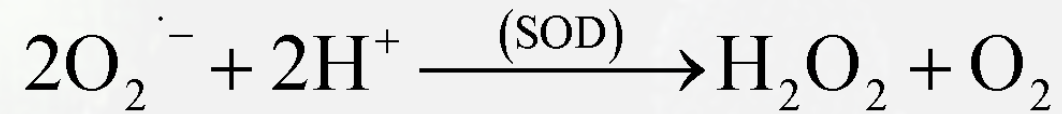


Na forma ativa (reduzida) (redução via Cu_A e $\text{cyt } a$), o complexo a_3 contém ferro(II) spin alto.

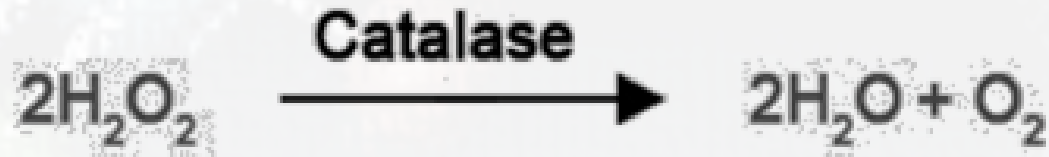


Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

SODs catalisam a desproporção (“dismutação”) de $O_2^{\cdot-}$ tóxico para O_2 e H_2O_2 . Essa reação também é catalisada por muitas espécies de metais de transição não enzimáticos, embora de forma menos controlada.



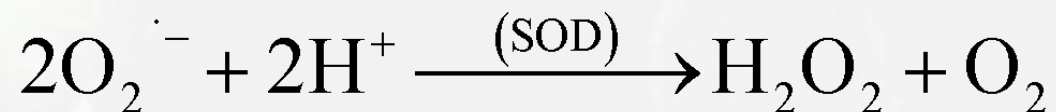
O peróxido de hidrogênio formado neste processo pode ainda ser desproporcional para produzir O_2 e H_2O em reações catalisadas por catalases, ou pode ser utilizado por meio de enzimas peroxidase



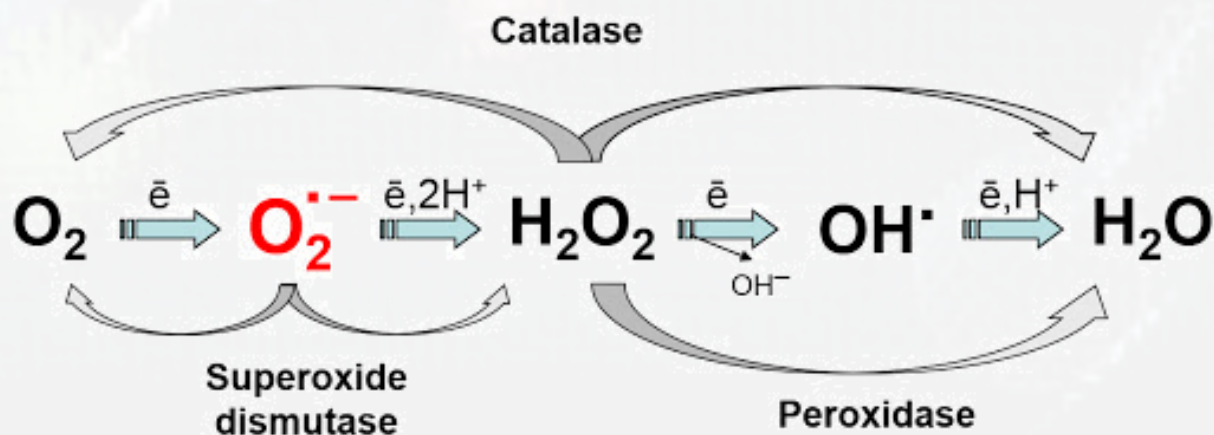
Além da SOD contendo Cu,Zn de eucariotos, existem outras formas que contêm níquel, ferro (SODs bacterianas e vegetais) ou manganês (SODs de mitocôndrias, bactérias).

Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

Considerando a metaestabilidade e a reatividade do ânion radical $O_2^{\cdot-}$, parece não haver necessidade de uma especificidade de catalisador especial de SODs; em essência, são necessários cátions de metal afins ao oxigênio que podem facilmente alterar seu número de oxidação em uma unidade.

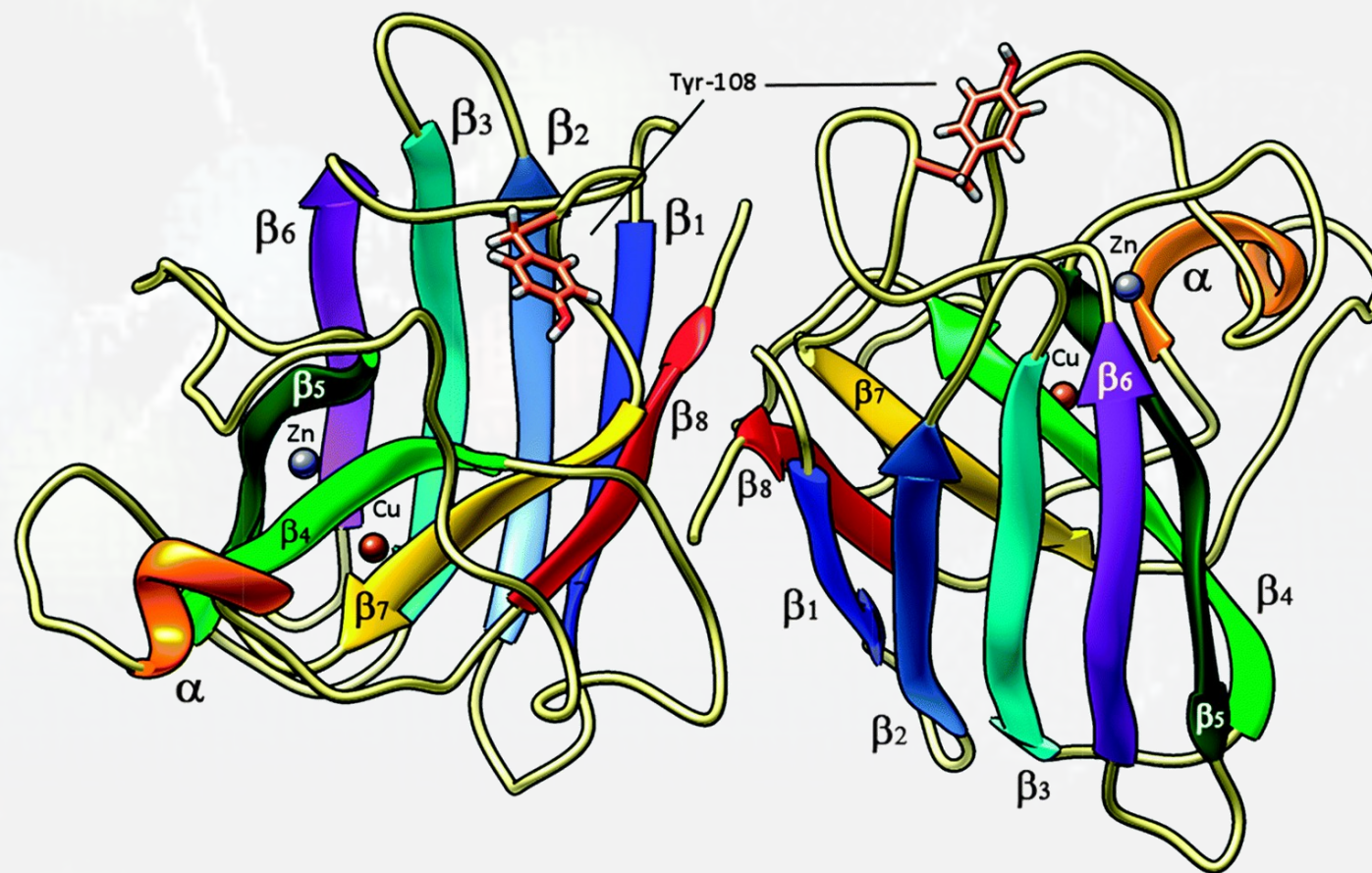


Em condições fisiológicas, a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ deve proceder muito rapidamente (na difusão), a fim de evitar oxidações descontroladas por este ânion radical ou seus subprodutos em reações com íons de metais de transição. Um dos principais requisitos para os SODs é sua resistência ao substrato agressivo, $O_2^{\cdot-}$, e aos produtos O_2^{2-} e O_2 .



Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

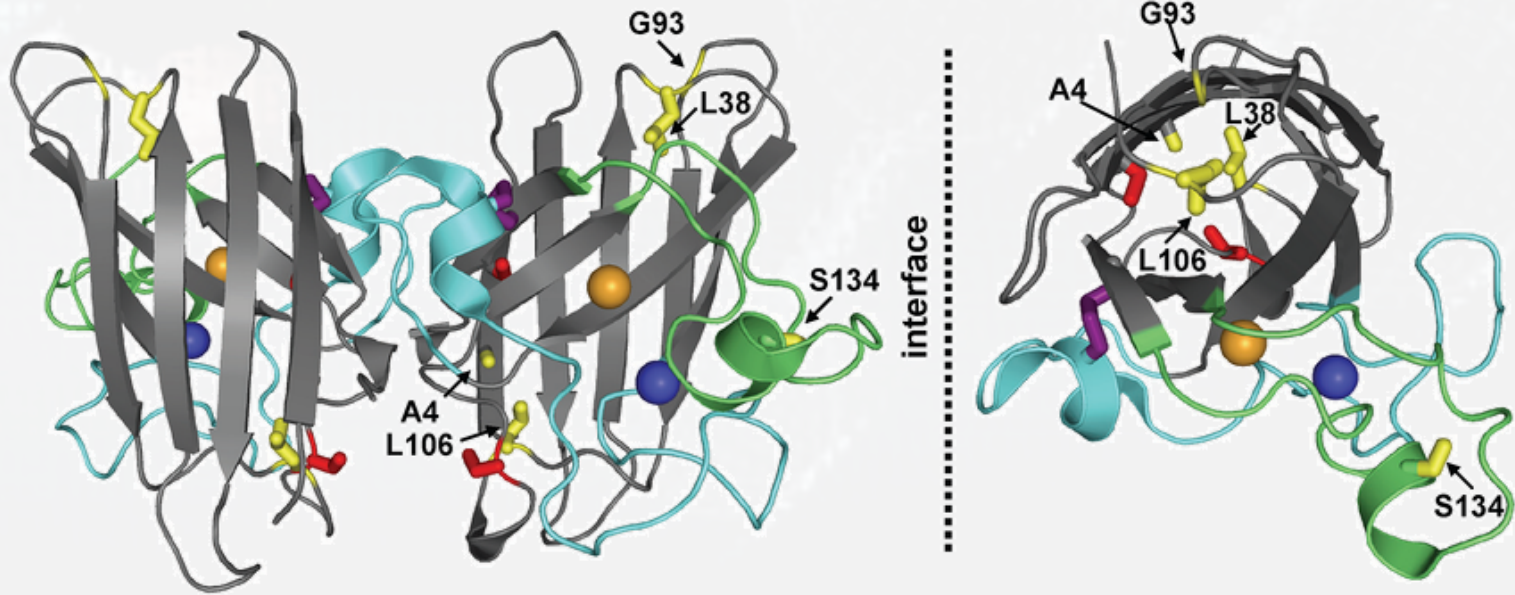
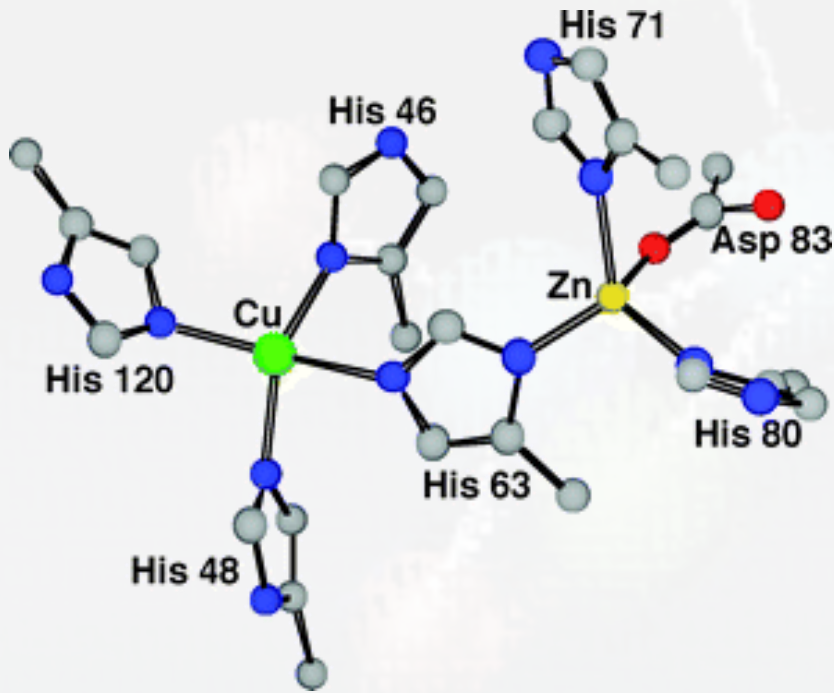
O relativamente pequeno (2×16 kDa) Cu,Zn-SOD de eritrócitos, é estruturalmente bem caracterizado. Cada subunidade contém um íon cobre e um íon zinco, ligados por um anel imidazolato desprotonado e estabilizado por ressonância de uma cadeia lateral de histidina. Os outros ligantes de aminoácidos são três His (Cu) e dois His e um Asp (Zn), respectivamente.



Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

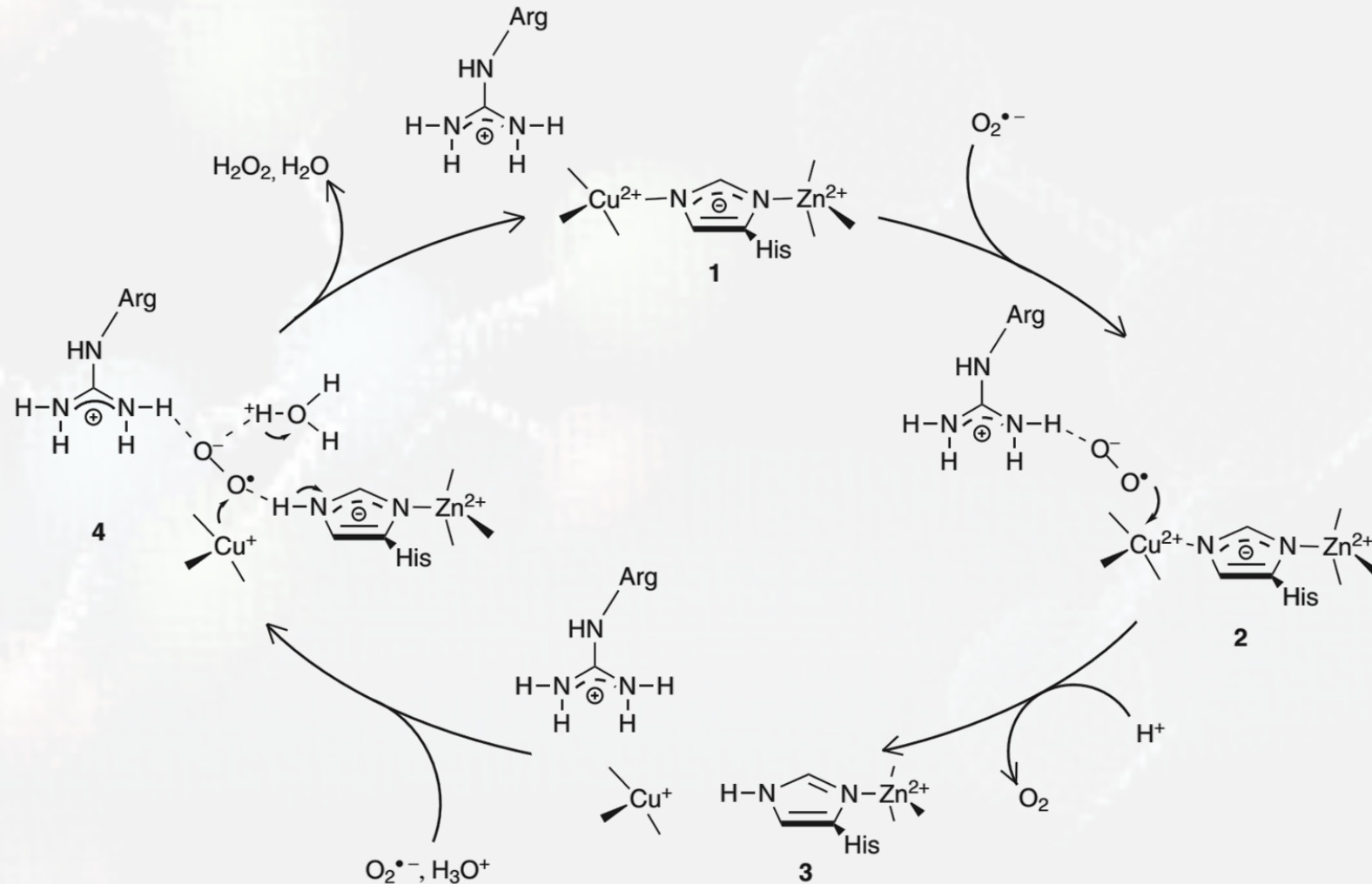
Cada subunidade contém um íon cobre e um íon zinco, ligados por um anel imidazolato desprotonado e estabilizado por ressonância de uma cadeia lateral de histidina. Os outros ligantes de aminoácidos são três His (Cu) e dois His e um Asp (Zn), respectivamente.

Em comparação com um tetraedro regular, a geometria é mais distorcida no cobre do que no centro de zinco



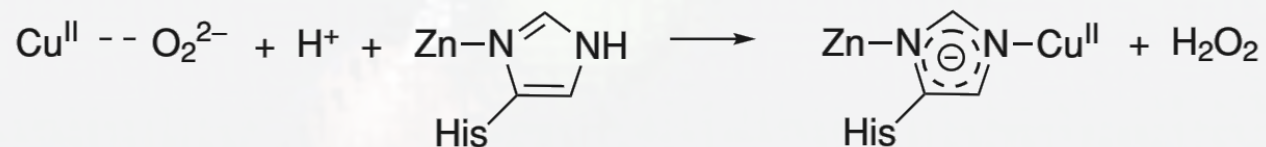
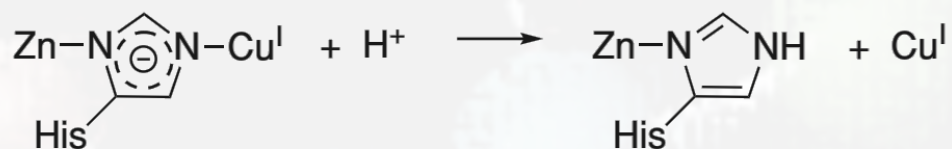
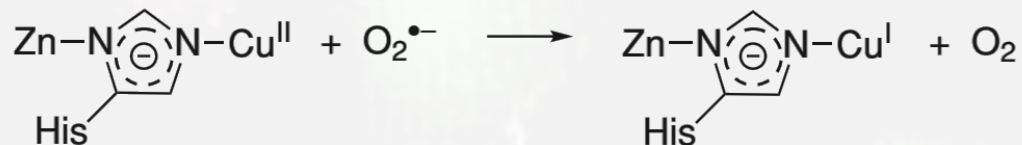
Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

O mecanismo detalhado da reação de dismutação envolve como sua parte essencial a capacidade do centro de cobre de oxidar superóxido metaestável em um estado de oxidação e reduzi-lo no outro.



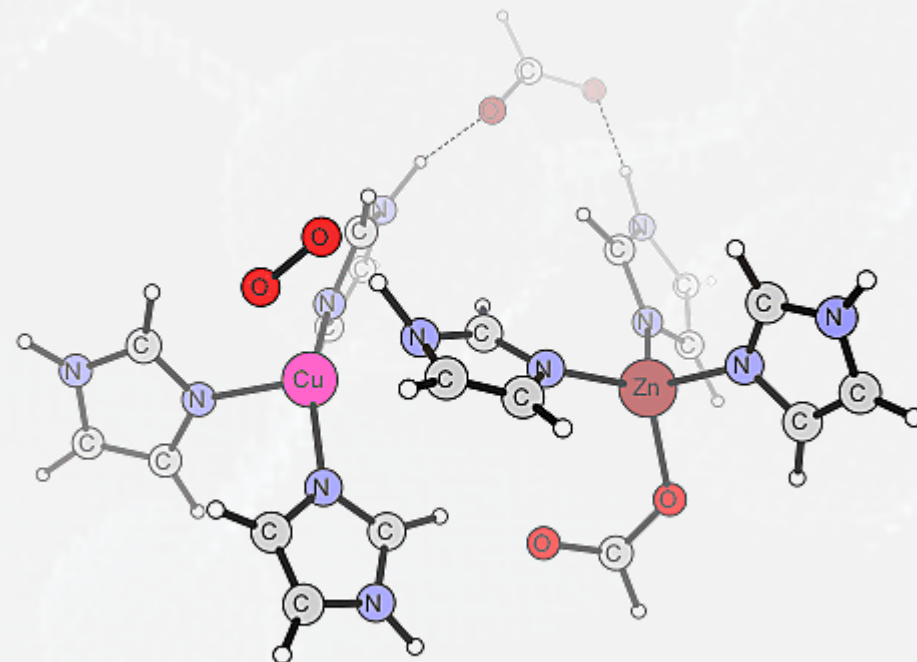
Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

O mecanismo detalhado da reação de dismutação envolve como sua parte essencial a capacidade do centro de cobre de oxidar superóxido metaestável em um estado de oxidação e reduzi-lo no outro.



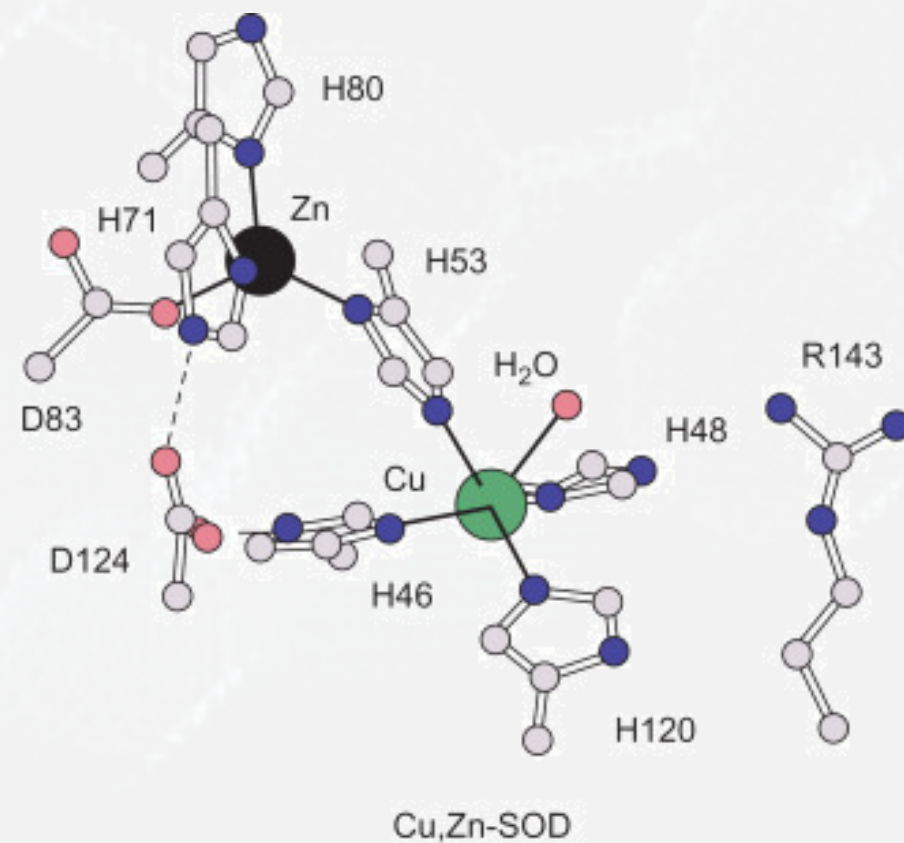
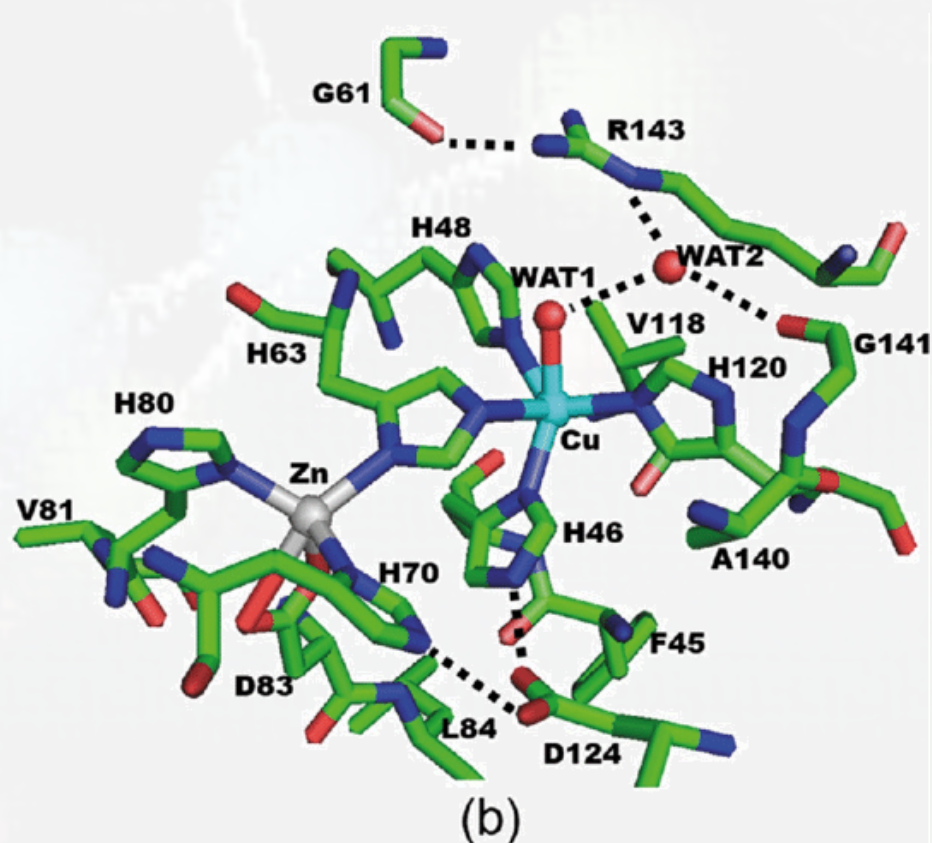
Zn: three-coordinate Zn^{II} center (2 His, 1 Asp⁻)

Cu: three-coordinate copper center (3 His)



Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

A reação quase controlada pela difusão da enzima com $O_2^{\cdot-}$ é fortemente auxiliada por interações eletrostáticas, que conduzem o pequeno $O_2^{\cdot-}$ para a proteína através de um canal, de aproximadamente 1–2 nm de profundidade. Perto do sítio catalítico, pode ser posicionado adicionalmente pelo grupo guanidínio carregado positivamente de um resíduo de arginina, que também oferece a possibilidade de ligação de hidrogênio.



Cu, Zn- e outras superóxido dismutases: Antioxidantes específicas

Em resumo, uma visão geral das atividades mais importantes do cobre biológico (além das funções regulatórias, de transporte e de armazenamento) revela sua estreita associação com o oxigênio, seus produtos de reação, como compostos N/O e seus metabólitos e com radicais inorgânicos e orgânicos.

Até agora, apenas cobre(I) e (II) foram estabelecidos como estados de oxidação biológica do cobre: um claro contraste com a faixa mais ampla de estado de oxidação do ferro de Fe(I) a (IV). Do ponto de vista dos químicos, isso reflete o caráter mais nobre do Cu vs. Fe.

