



Bioinorgânica de outros metais de transição

*Dr. Tiago P. Camargo*





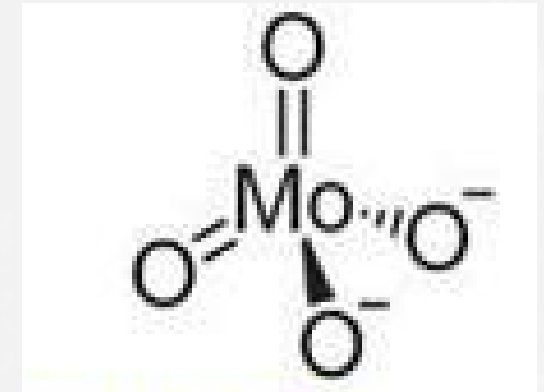
## ***Transferência de oxigênio por meio de enzimas contendo tungstênio e molibdênio***

O molibdênio é o elemento biologicamente mais importante desta série, onde sua química e função enzimática estão presentes na transferência de oxigênio e fixação de nitrogênio.

Do ponto de vista químico, no entanto, essa distinção é bastante peculiar: de acordo com o conhecimento atual, o molibdênio é o único elemento do segundo (4d) período dos metais de transição com uma função biológica.

Biodisponibilidade: embora o molibdênio seja bastante raro na crosta terrestre, é bastante solúvel em água (do mar) em pH 7 (aproximadamente 100 mM) em sua forma hexavalente mais estável como molibdato(VI),  $\text{MoO}_4^{2-}$ .

Em contraste com o molibdato, os oxometalatos,  $\text{MO}_n^{m-}$ , do tungstênio, e especialmente daqueles metais à esquerda no sistema periódico, como nióbio, tântalo, zircônio e háfnio, são quase insolúveis em pH 7 devido à agregação; por outro lado, os elementos 4d e 5d à direita de Mo e W no sistema periódico, tecnécio, rênio e os metais da platina, são obviamente raros demais para ter qualquer significado biológico.



## Transferência de oxigênio por meio de enzimas contendo tungstênio e molibdênio

O molibdênio é o elemento biologicamente mais importante desta série, onde sua química e função enzimática estão presentes na transferência de oxigênio e fixação de nitrogênio.

| Enzyme                     | Molecular mass (kDa) | Prosthetic groups                                    | Typical function  |
|----------------------------|----------------------|--|---|
| xanthine oxidase           | 275<br>(dimer)       | 2 Mo,<br>4 Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ,<br>2 FAD | oxidation of xanthine to uric acid in liver and kidney (11.11), (11.12)   |
| nitrate reductase          | 228<br>(dimer)       | 2 Mo, 2 cyt <i>b</i> ,<br>2 FAD                      | nitrate/nitrite transformation in plants and microorganisms (11.2):<br><br>$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{NO}^- + \text{H}_2\text{O}$                          |
| aldehyde oxidase           | 280<br>(dimer)       | 2 Mo,<br>4 Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ,<br>2 FAD | oxidation of aldehydes, heterocycles, amines and sulfides in liver  |
| sulfite oxidase            | 110<br>(dimer)       | 2 Mo, 2 cyt <i>b</i>                                 | sulfite/sulfate transformation in liver (sulfite detoxification, (11.5)):<br><br>$\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{SO}_4^{2-} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$            |
| arsenite oxidase           | 85                   | Mo, Fe <sub>n</sub> S <sub>n</sub>                   | transformation of thiolate-blocking AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup> by microorganisms:<br><br>$\text{AsO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AsO}_4^{3-} + 2\text{e}^- + 4\text{H}^+$ |
| formate dehydrogenase (Mo) | >100                 | Mo, Fe <sub>n</sub> S <sub>n</sub> , Se              | CO, reduction by microorganisms:<br><br>$\text{HCOO}^- \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{e}^- + \text{H}^+$   |
| formate dehydrogenase (W)  | 340                  | W, Fe <sub>n</sub> S <sub>n</sub> , Se               | CO, reduction by microorganisms:<br><br>$\text{HCOO}^- \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{e}^- + \text{H}^+$   |



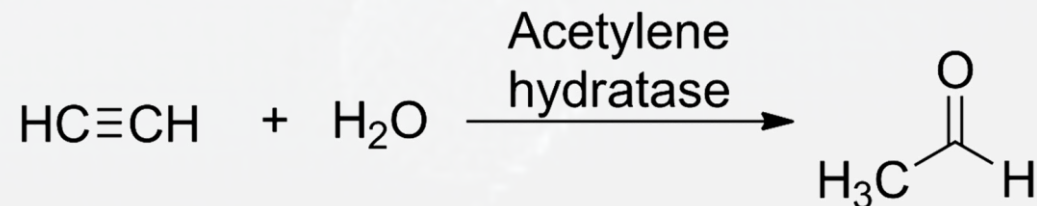
## Transferência de oxigênio por meio de enzimas contendo tungstênio e molibdênio

Em 1983, um formiato (HCOO<sup>-</sup>) desidrogenase isolado de *Clostridium thermoaceticum* foi descrito que, além de ferro, enxofre e selênio, continha tungstênio em vez de molibdênio como seu componente ativador

Desde então, vários outros microorganismos incorporadores de tungstênio foram descobertos, particularmente em archaeobactérias termofílicas ( $\approx 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e hipertermofílicas ( $\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

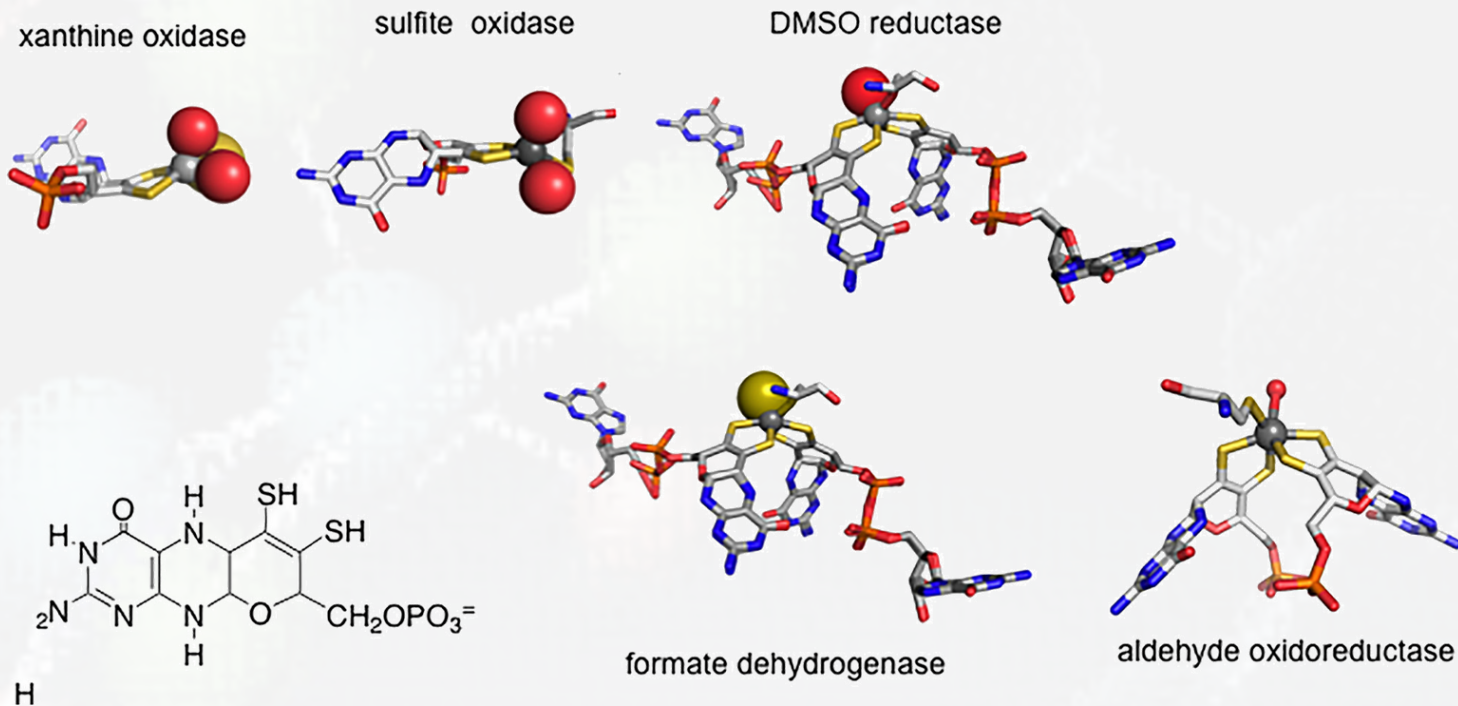
Enzimas análogas de W e Mo são muito semelhantes quanto à composição e função de transferência de oxigênio. De modo geral, as enzimas contendo tungstênio requerem temperaturas mais altas e um potencial redox mais negativo para as transições entre as formas hexavalente, pentavalente e tetravalente correspondentes.

Uma enzima de tungstênio não redox ativa é a acetileno hidratase, que catalisa a reação:



## Transferência de oxigênio por meio de enzimas contendo tungstênio e molibdênio

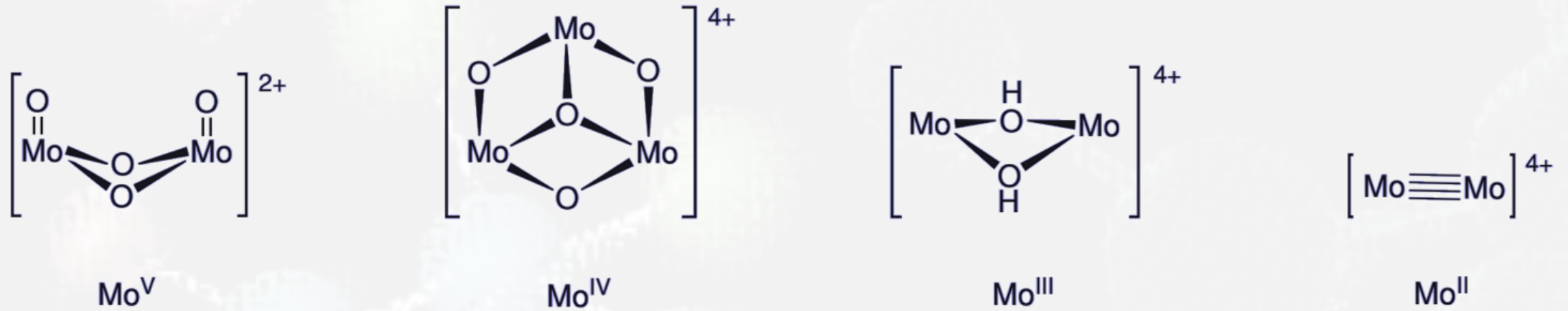
O íon cromato(VI), análogo ao  $\text{MoO}_4^{2-}$  é também bastante solúvel em pH 7, se comporta como um oxidante forte e, portanto, é instável em condições fisiológicas. Na verdade,  $\text{CrO}_4^{2-}$  é mutagênico e cancerígeno.



As molibdoenzimas constituem outra classe de hidroxilase (oxidase), além das proteínas que contêm ferro e cobre. Além disso, um "cofator FeMo" desempenha um papel essencial na forma principal da enzima nitrogenase fixadora de dinitrogênio ( $\text{N}_2$ ).

## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Para estados de oxidação inferiores a 6+, a química do molibdênio em solução aquosa é caracterizada por fenômenos de agregação; ou seja, pela formação de "clusters".



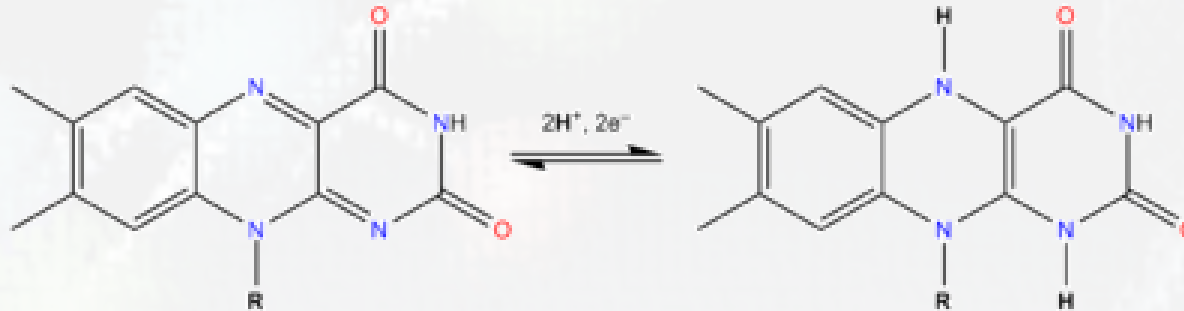
Tal agregação pode ser suprimida na presença de uma proteína que atua como um sistema quelato e protetor ou a utilização de ligantes de cofator especiais, com o resultado de que uma química de coordenação biológica bastante "incomum" desses estados de oxidação se desenvolva.



## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Os estados de oxidação fisiologicamente relevantes do molibdênio situam-se entre (IV) e (VI), e os potenciais redox correspondentes de cerca de -0,3 V estão na faixa fisiologicamente aceitável, em contraste com aqueles de complexos de cromo homólogos.

Uma das funções biológicas mais importantes do Mo em enzimas é a catálise da transferência controlada de oxigênio para um substrato, que envolve componentes de transferência de elétrons separados espacialmente, como citocromos, centros de Fe/S ou flavinas.



Uma transferência de elétrons e troca de óxido simultânea, leva à transferência formal de um átomo de oxigênio do centro do metal para o substrato ou vice-versa.

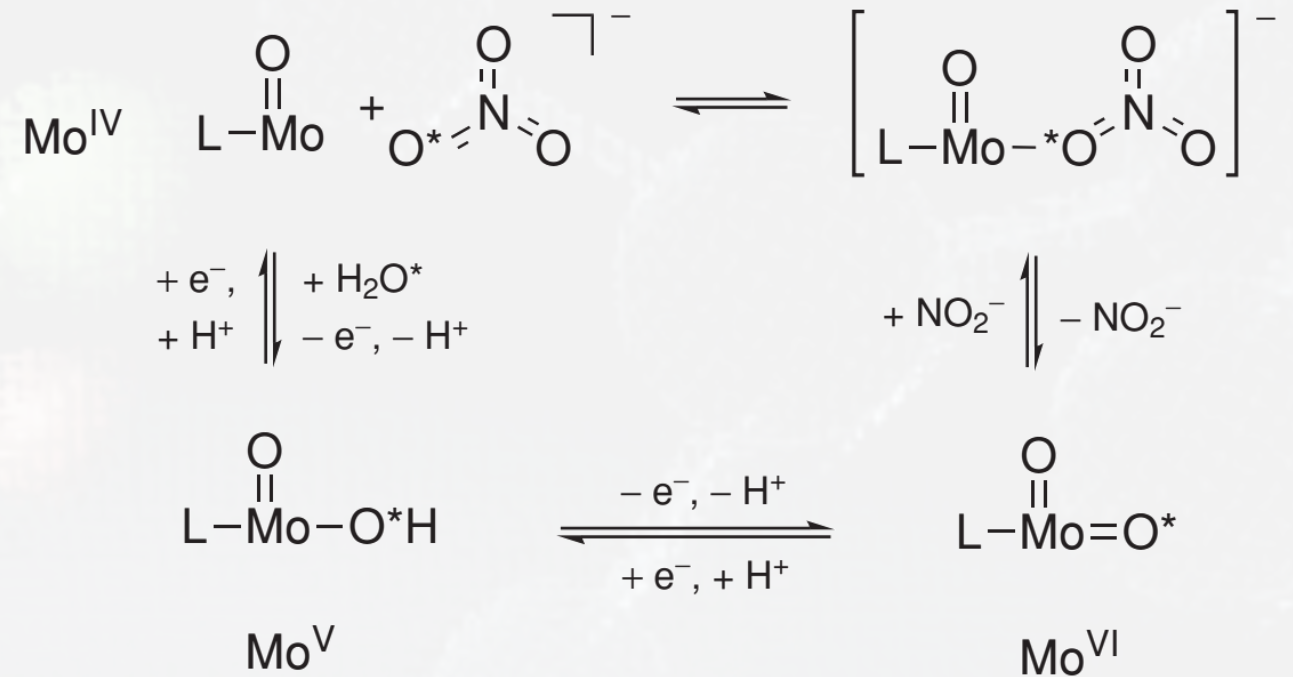
Atividade de oxotransferase:  $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{O}_2 + \text{X} \text{LMo}^{\text{IV}}\text{O} + \text{XO}$



## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

O oxigênio transferido não se origina do O<sub>2</sub> (oxigenação), como é frequentemente o caso com hidroxilases contendo Fe e Cu (oxigenases), e o resultado é uma separação temporal e espacial da transferência de elétrons e a translocação real de oxigênio.

A regeneração da enzima reduzida pode prosseguir via O<sub>2</sub> como oxidante eventual, um processo que pode produzir peróxidos ou superóxido, como é bem conhecido, por exemplo, a partir da xantina oxidase.



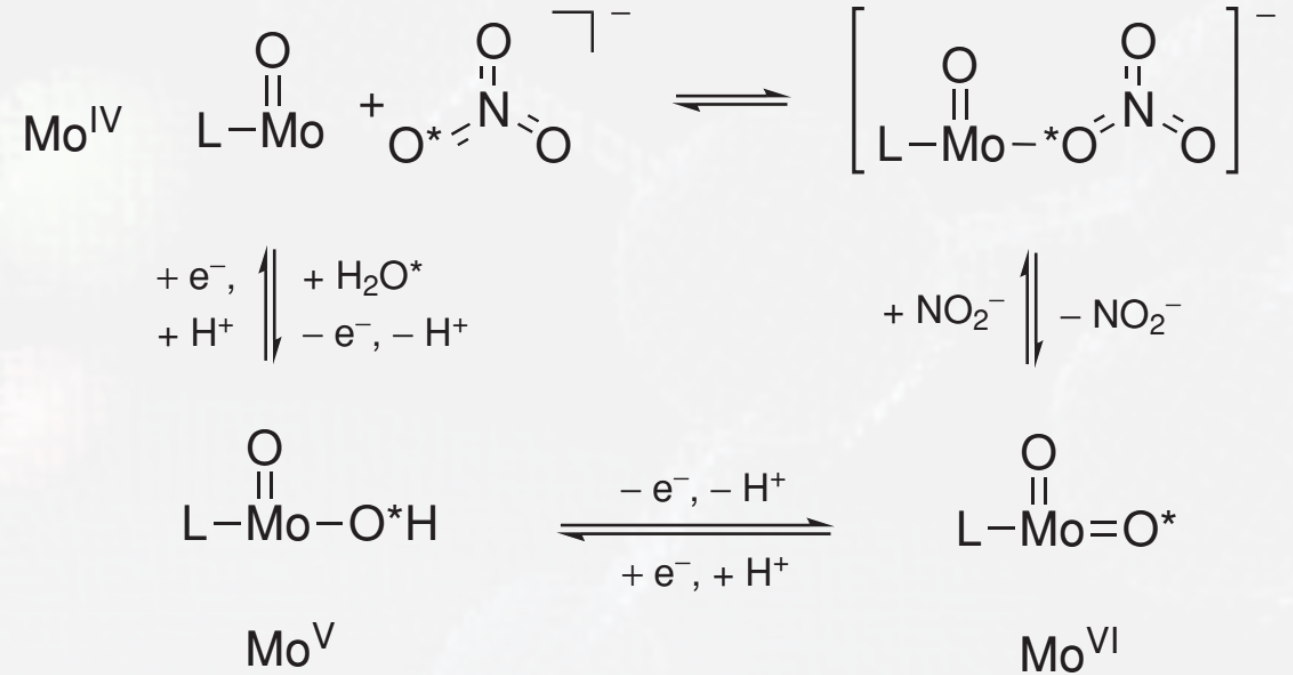
L: ligands in the coordination sphere of molybdenum

O\*: <sup>18</sup>O labelling

## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

O oxigênio transferido não se origina do O<sub>2</sub> (oxigenação), como é frequentemente o caso com hidroxilases contendo Fe e Cu (oxigenases), e o resultado é uma separação temporal e espacial da transferência de elétrons e a translocação real de oxigênio.

Em bioquímica, "oxidação" significa perda de elétrons (oxidase ou oxidoredutase), eliminação de hidrogênio (desidrogenase) ou introdução de oxigênio (oxigenase ou hidroxilase). Para as oxigenases dependentes de O<sub>2</sub>, é feita uma distinção entre mono- e dioxigenases e, mecanisticamente, a "transferência de oxigênio" pode prosseguir na forma sequencial: O = O•<sup>-</sup> - e<sup>-</sup> (sistemas P-450) = O<sup>2-</sup> - 2e<sup>-</sup> (Enzimas Mo).



L: ligands in the coordination sphere of molybdenum

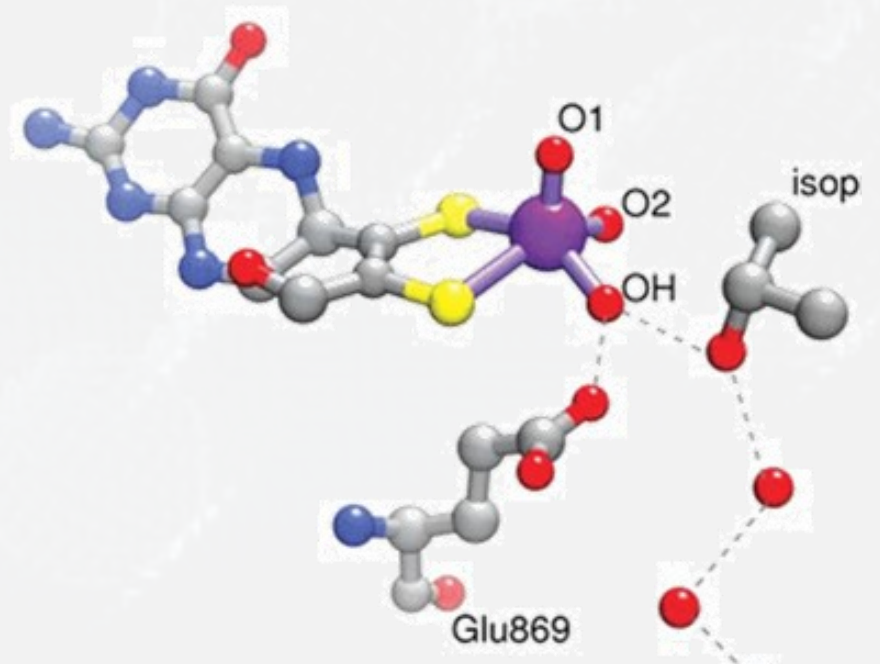
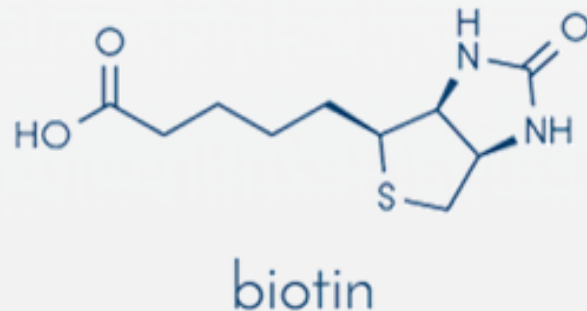
O\*: <sup>18</sup>O labelling

## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Várias hidroxilases dependentes de molibdênio são conhecidas, sendo as mais bem caracterizadas a xantina oxidase, a sulfito oxidase e a nitrato redutase.

Outras enzimas contendo Mo também têm funções bioquímicas muito importantes: as aldeído oxidases participam do metabolismo do álcool, vários heterociclos de nitrogênio obtêm C-H oxigenado em posição  $\alpha$  a N, e outras variedades de enzimas Mo catalisam a transferência de O para amina/óxido de amina, arsenito/arseniato e sulfeto/sulfóxido.

A última reação desempenha um papel importante na conversão de D-biotina-5-óxido na biotina coenzimática real (vitamina H), bem como na transformação de dimetilsulfóxido (DMSO) em dimetilsulfeto, que é altamente importante para o enxofre global ciclo e clima

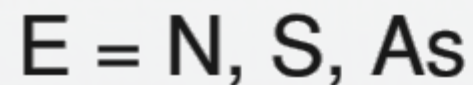
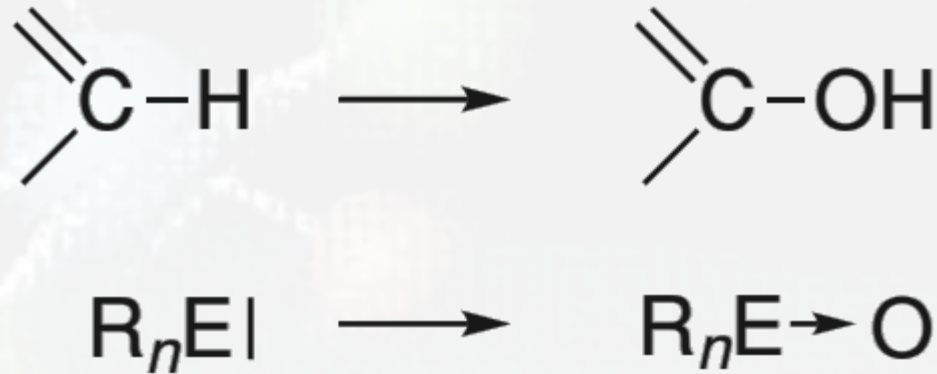




## ***Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina***

Várias hidroxilases dependentes de molibdênio são conhecidas, sendo as mais bem caracterizadas a xantina oxidase, a sulfito oxidase e a nitrato redutase.

Formato e formilmetanofurano desidrogenases contendo molibdênio ou tungstênio são essenciais para o metabolismo C1 ( $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ ) em microrganismos. Em termos gerais, as molibdoenzimas catalisam as reações descritas abaixo:

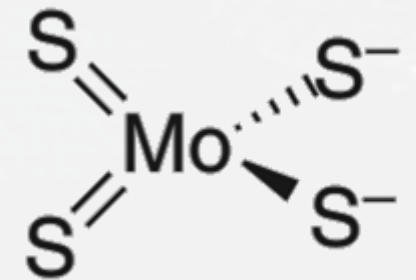
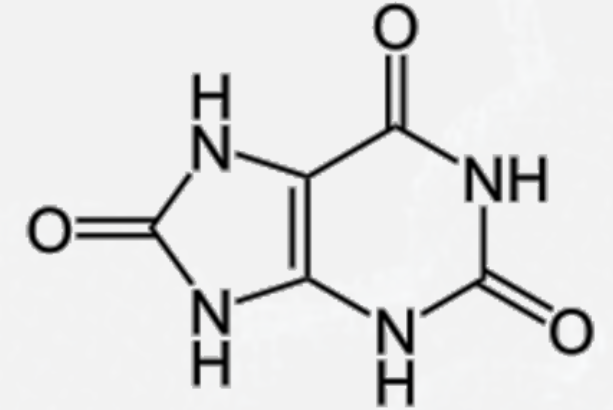


## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

As disfunções das molibdoenzimas em organismos superiores são conhecidas e se manifestam, por exemplo, em problemas do metabolismo das purinas (gota, disfunção da xantina oxidase) ou em distúrbios neurológicos (disfunção da sulfito oxidase).

*Gota - uma doença em que o metabolismo defeituoso do ácido úrico causa artrite, especialmente nos ossos menores dos pés, depósito de calcário e episódios de dor aguda.*

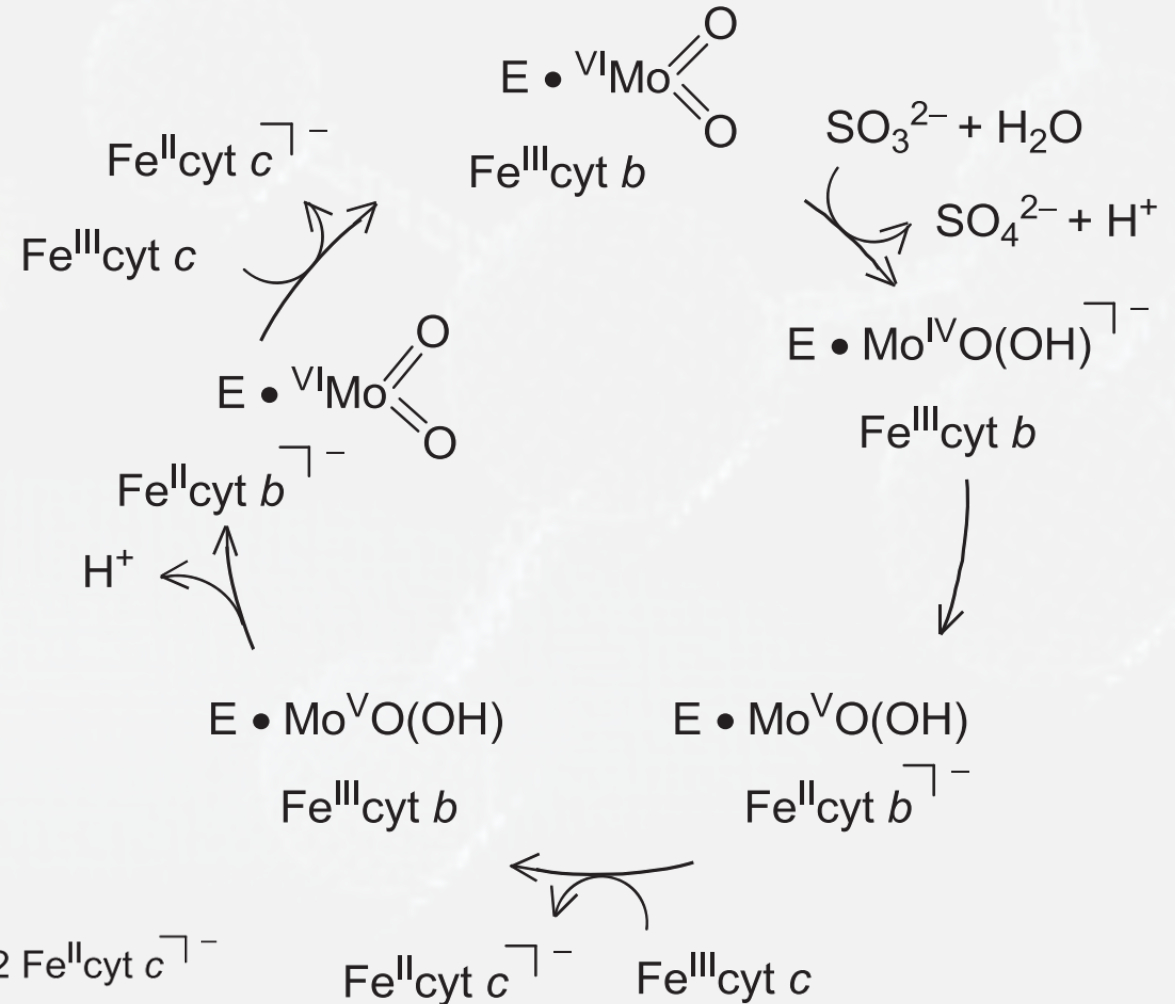
Os tetratiomolibdatos(VI), que são formados no estômago complexo de ruminantes a partir de molibdato e sulfeto, não apenas exibem uma transição intensa de cor (transição eletrônica TCLM de baixa energia  $S^{2-} \rightarrow Mo^{6+}$ ), mas também atuam como ligantes quelantes eficientes para íons metálicos carregados positivamente, como  $Cu^+$ .



## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Em oxidações biológicas que não são diretamente dependentes de  $O_2$ , os equivalentes de oxidação são disponibilizados em etapas de um elétron por meio de proteínas de transferência de elétrons. Portanto, quase todas as molibdoenzimas contêm componentes de transferência de elétrons, como citocromos, centros de Fe/S ou flavinas.

Ciclo catalítico funcional simples para a oxidação de sulfito a sulfato, onde  $Mo^{5+}$  (d1) é observado como um intermediário detectável (EPR). Os ligantes óxidos tornam-se protonados após a redução devido à sua forte basicidade ou serão substituídos por hidróxido da água circundante após a transferência completa do átomo de oxigênio.



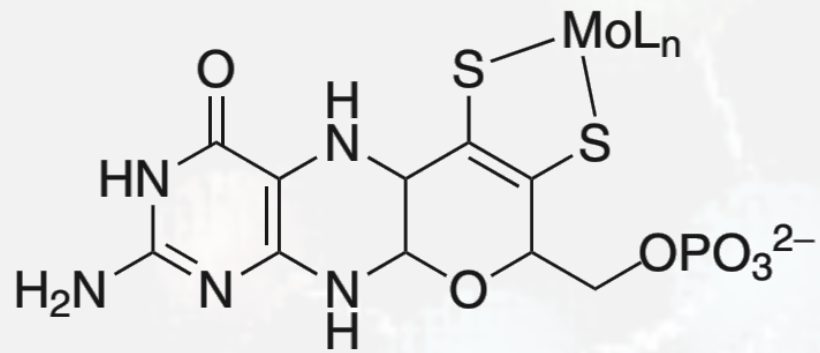
E: (apo-)enzyme; Fe cyt: cytochrome with iron oxidation state



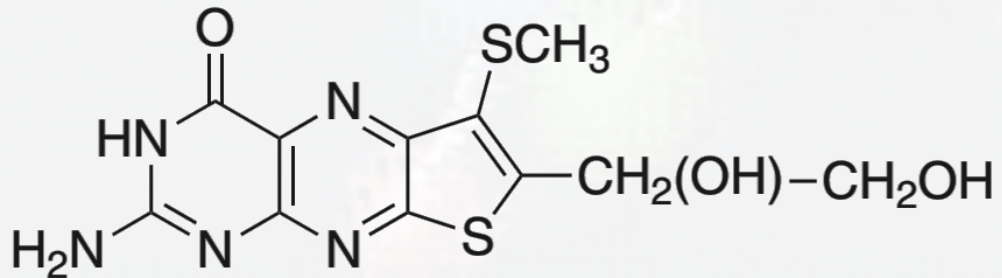


## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Todas as hidroxilases contendo molibdênio ou tungstênio contêm um cofator Mo ou W, que consiste em molibdênio (ou tungstênio) e um ligante especial de molibdopterina/tungstopterina. Este é um derivado da tetra-hidropterina, que tem uma função quelato eno-1,2-ditiolato/"ditioleno" muito característica de coordenação de metal.

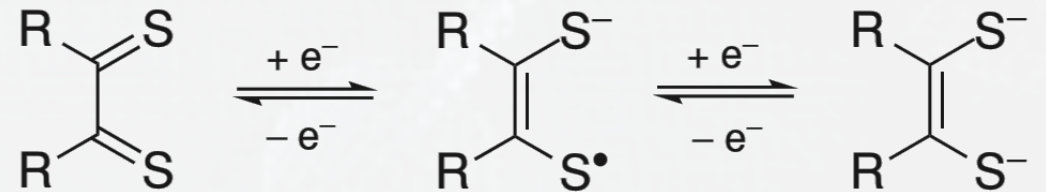


Mo-cofactor ("Moco");  $L_n$ : ligands



urothione

Em sua forma metabolizada, a pterina é encontrada na urina humana como urotione; "bactopterinas" contendo nucleotídeos com basicamente o mesmo cromóforo da molibdopterina foram isoladas de microorganismos.

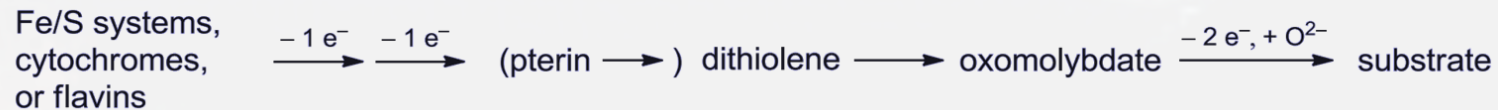
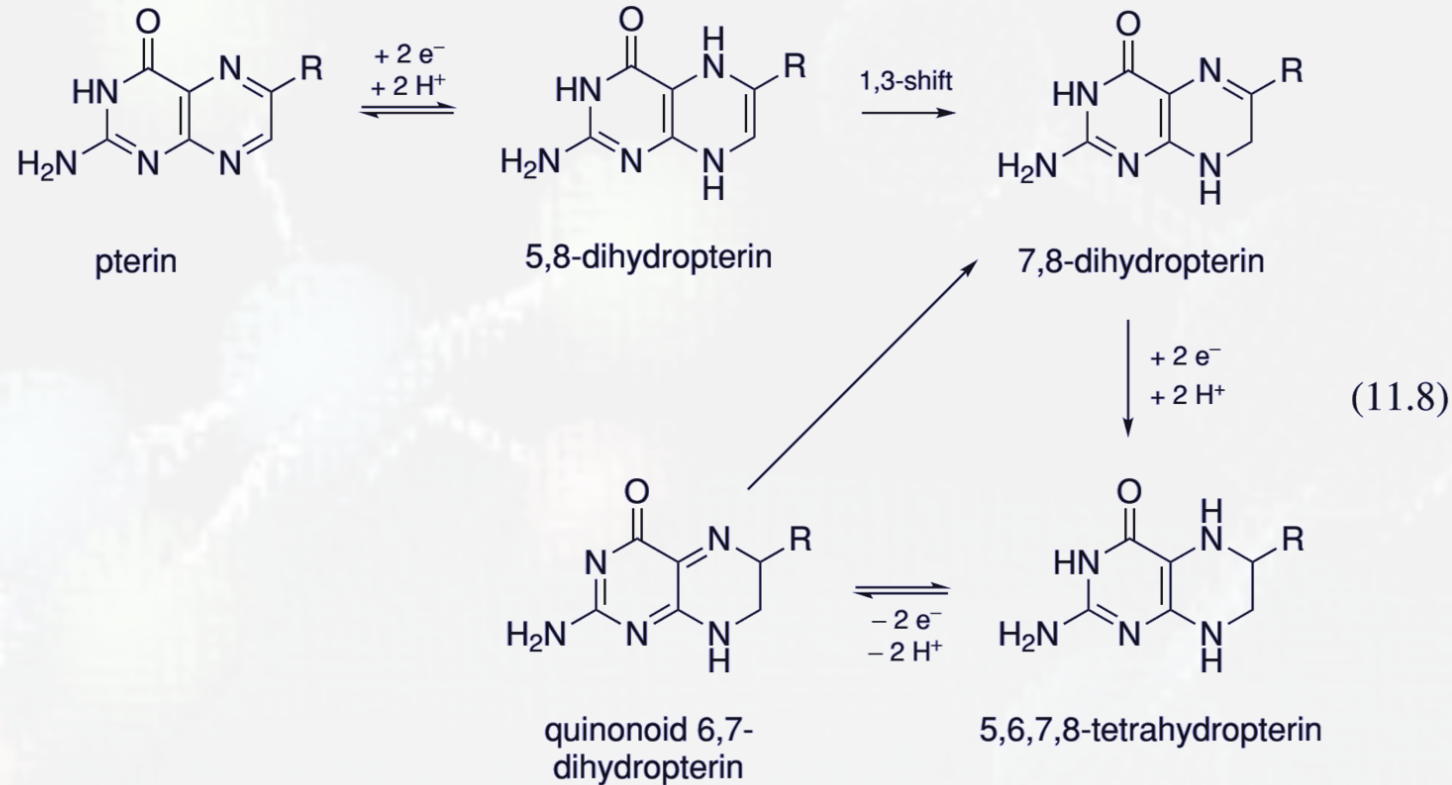


1,2-dithio-1,2-diketone

enedithiolate(2-)

## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

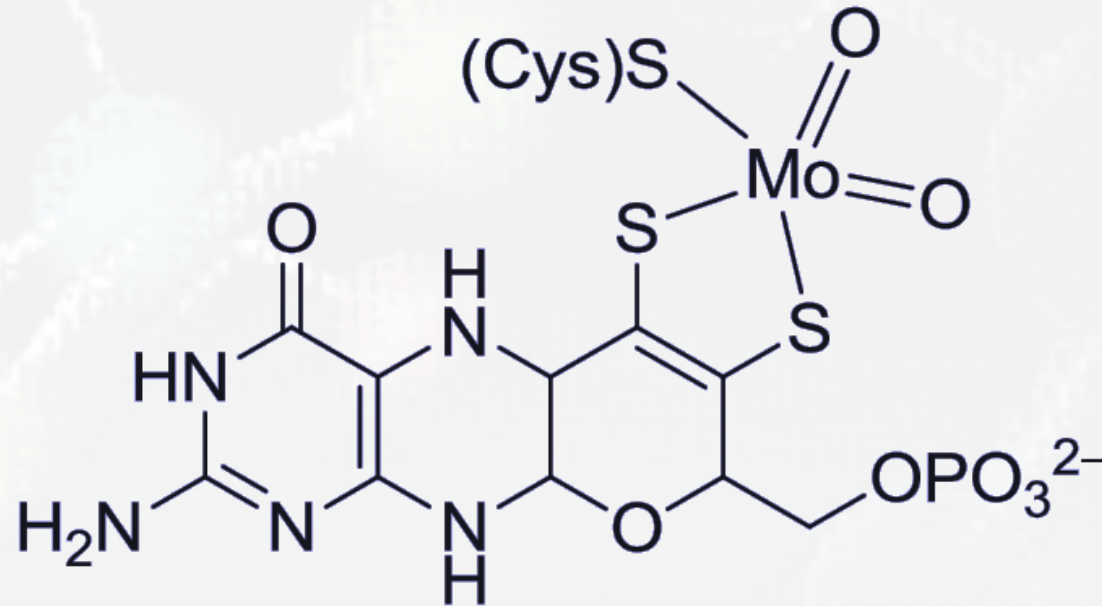
Como sistemas pi redox-ativos e coordenantes, os ditiolenos e as pterinas são ligantes potencialmente não inocentes; uma cadeia de transferência de elétrons hipotética consistindo de vários componentes pode então ser formulada:



## ***Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina***

Com base no modo de coordenação do Mo(VI), três famílias de molibdoenzima são diferenciadas.

A família da sulfito oxidase é caracterizada por uma piranopterina coordenada em S,S', um ligante de cisteína e por funções oxo do metal, que podem ser convertidas por redução.



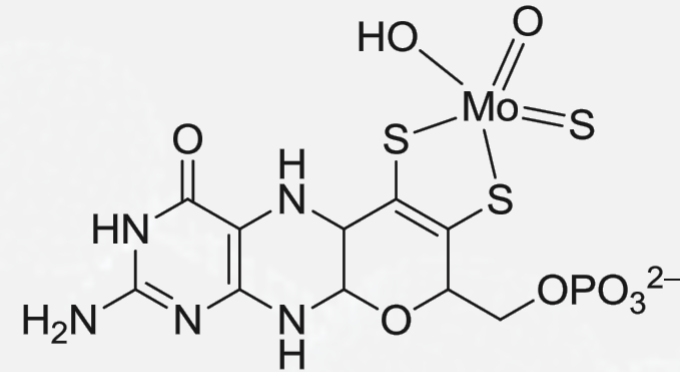
sulfite oxidase type



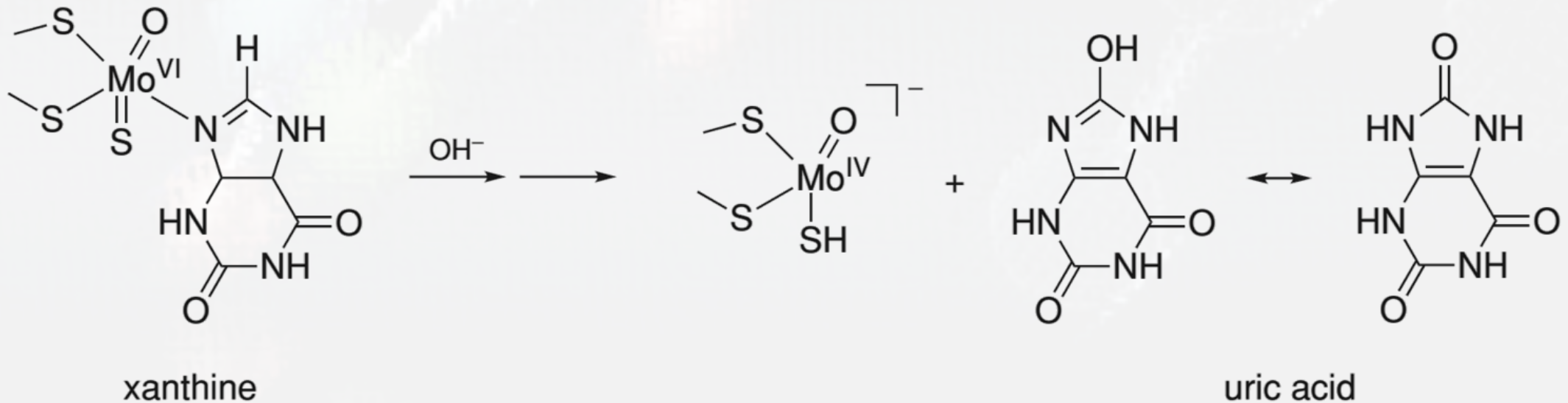
## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Com base no modo de coordenação do Mo(VI), três famílias de molibdoenzima são diferenciadas.

O Mo(VI) das enzimas da família da xantina oxidase, um ligante de sulfeto é ligado a uma distância Mo-S de 215 pm.



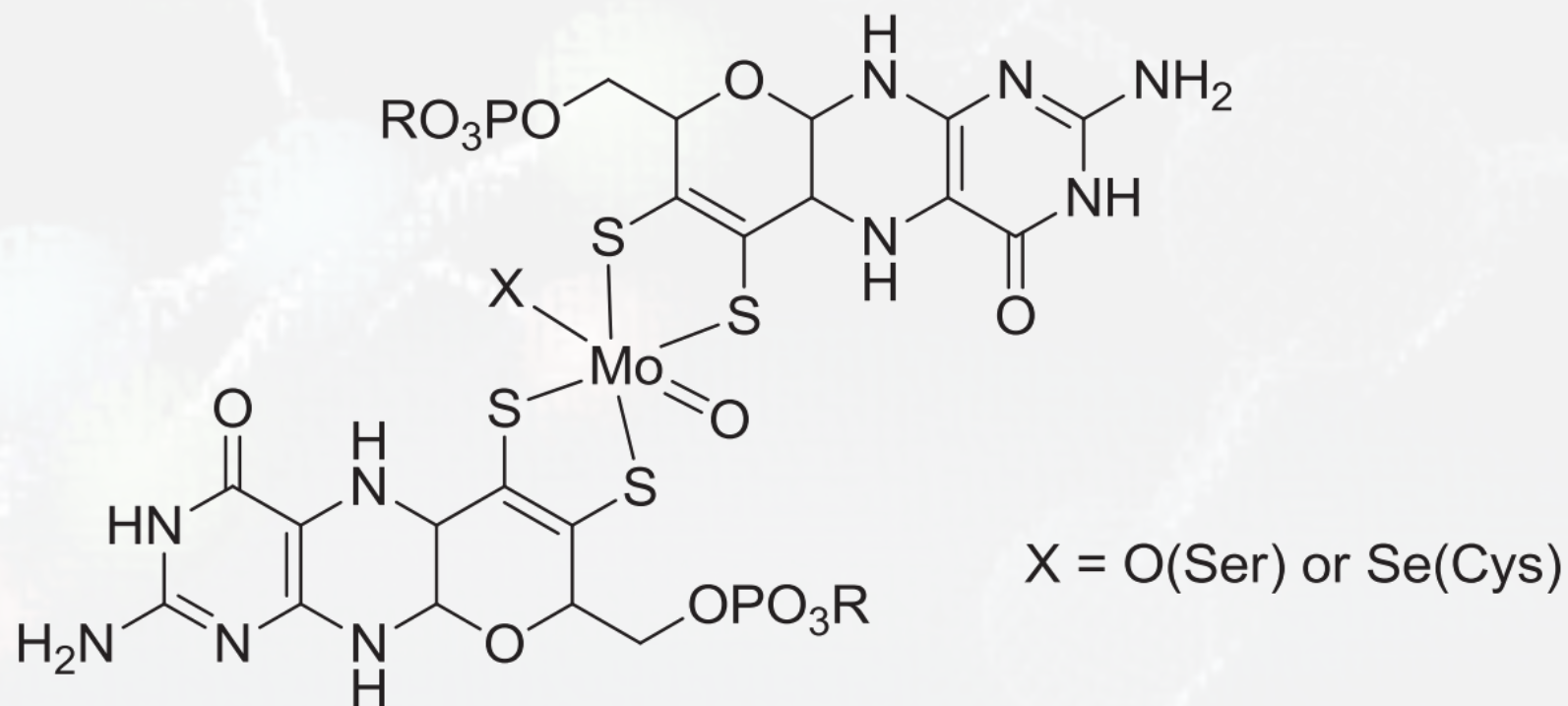
xanthine oxidase type



## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

Com base no modo de coordenação do Mo(VI), três famílias de molibdoenzima são diferenciadas.

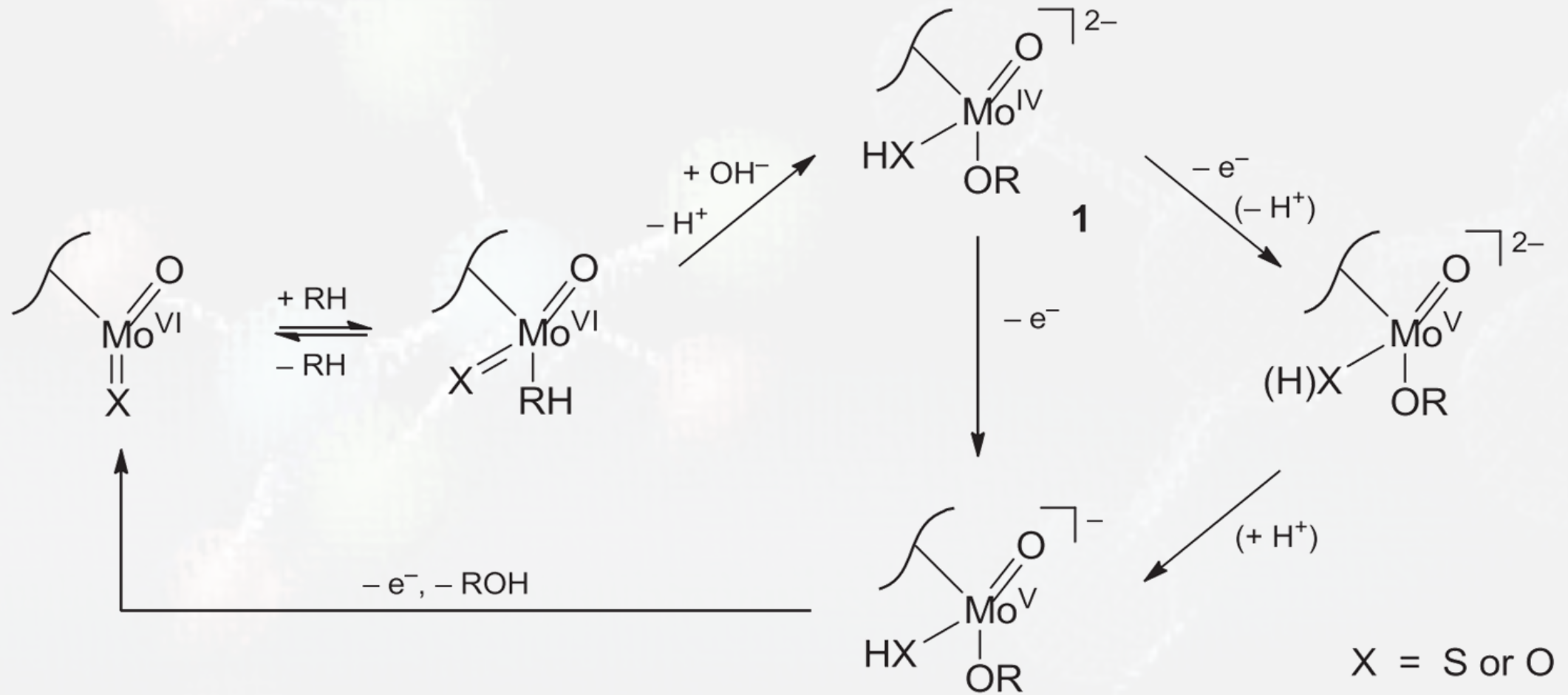
A família da DMSO redutase de molibdoenzimas envolve dois ligantes de piranopterina, uma função oxo e um outro ligante monodentado, como cisteinato, selenocisteinato, serina ou aspartato.



DMSO reductase type

## Enzimas oxotransferases contendo o cofator de molibdopterina ou tungstopterina

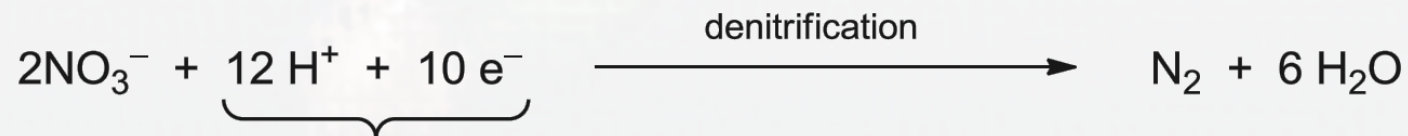
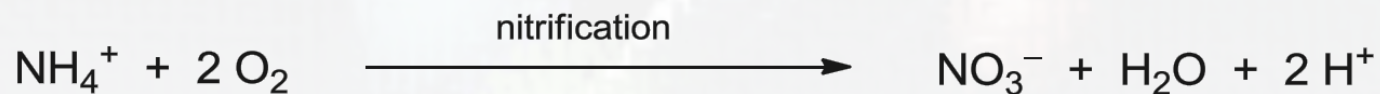
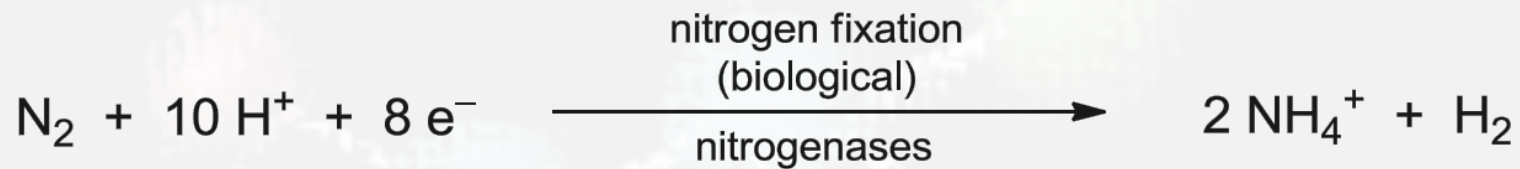
As espécies de  $\text{Mo}^{5+}$  são freqüentemente observadas por EPR durante a reoxidação gradual de  $\text{Mo}^{4+}$  após a transferência de oxigênio completa para o substrato.





## ***Metaloenzimas no ciclo biológico de N<sub>2</sub>: fixação de nitrogênio dependente de molibdênio***

A maioria dos sistemas biológicos que participam do ciclo global do nitrogênio contém enzimas que requerem metais. Três processos principais podem ser distinguidos: fixação de nitrogênio, nitrificação e desnitrificação.



(from "biomass",  
i.e. reduced carbon  
compounds)

## ***Metaloenzimas no ciclo biológico de N<sub>2</sub>: fixação de nitrogênio dependente de molibdênio***

O processo oxidativo de nitrificação produz nitrato: o estado de oxidação no qual o nitrogênio pode ser assimilado pela maioria das plantas superiores. O desafio crucial nesta reação é evitar a formação da molécula de N<sub>2</sub> (estável) no estado de oxidação zero.

A desnitrificação requer condições bastante anaeróbicas e substâncias orgânicas como redutores. A importância fisiológica potencial do monóxido de nitrogênio como um radical livre, NO•, ou como um intermediário NO<sup>+</sup> coordenado por metal, está apenas começando a ser percebida. O produto final da desnitrificação é a molécula de N<sub>2</sub> extremamente estável, inerte e volátil.

Devido à estabilidade termodinâmica da molécula de dinitrogênio, sua redução requer uma grande quantidade de energia na forma de vários equivalentes de ATP (com Mg<sup>2+</sup> como catalisador de hidrólise) e seis elétrons por N<sub>2</sub> em um potencial fisiologicamente bastante negativo de menos de -0,3 V .

| <i>Oxidation state</i> | <i>Species</i>                                  | <i>Name</i>               |
|------------------------|---|---------------------------|
| -3                     | NH <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | Ammonia, ammonium ion     |
| -2                     | N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>                   | Hydrazine                 |
| -1                     | NH <sub>2</sub> OH                              | Hydroxylamine             |
| 0                      | N <sub>2</sub>                                  | Nitrogen                  |
| +1                     | N <sub>2</sub> O                                | Nitrous oxide             |
| +2                     | NO  | Nitric oxide              |
| +3                     | HNO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Nitrous acid, nitrite ion |
| +4                     | NO <sub>2</sub>                                 | Nitrogen dioxide          |
| +5                     | HNO <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Nitric acid, nitrate ion  |

## Metaloenzimas no ciclo biológico de $N_2$ : fixação de nitrogênio dependente de molibdênio

Os baixos potenciais redox e a alta reatividade das nitrogenases requerem ainda a ausência de moléculas competidoras, tais como  $O_2$ . Portanto, microrganismos assimiladores de  $N_2$  são anaeróbios obrigatórios ou possuem mecanismos de proteção para a exclusão de  $O_2$  do sítio ativo dessas enzimas. Esses mecanismos incluem proteínas que contêm ferro, que funcionam como sensores de  $O_2$ . A atividade da nitrogenase também é inibida pelos substratos isoeletrônicos monóxido de carbono,  $-C\equiv O^+$  e  $N\equiv O^+$ ; produtos de reação característicos são obtidos com várias outras pequenas moléculas contendo ligações múltiplas.

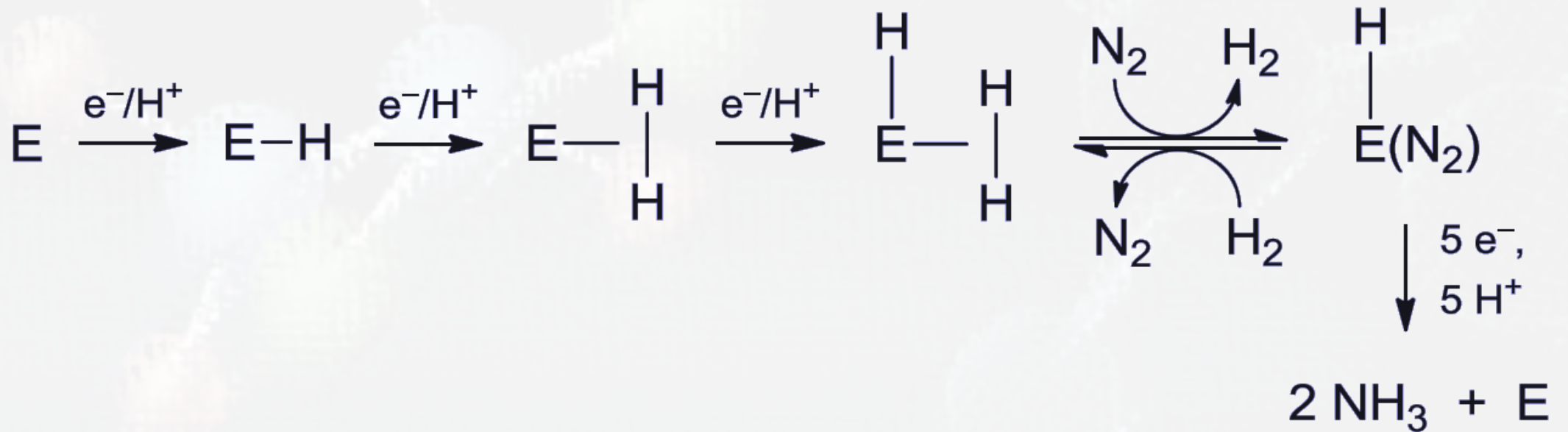
**Table 11.2** Reduction (hydrogenation) reactions catalyzed by nitrogenases.

| Substrate   | Products   | Number of electrons required |
|---|--|------------------------------|
| $IN\equiv NI$   | $2 NH_3 + H_2$   | $8 e^-$                      |
| $H-C\equiv C-H$   | $C_2H_4$ or $Z-C_2H_2D_2$ (from $C_2D_2$ ) <sup>a</sup>  | $2 e^-$                      |
| $H-C\equiv NI$  | $CH_4 + NH_3 (CH_3NH_2)$   | $6 e^- (4 e^-)$              |
| $H_3C-N^+\equiv Cl^-$   | $CH_3NH_2 + CH_4$  | $6 e^-$                      |
| $\langle N=N^+=N \rangle^-$   | $N_2H_4 + NH_3 (N_2 + NH_3)$   | $6 e^- (2 e^-)$              |
| $\langle N=N^+=O \rangle^-$   | $N_2 + H_2O$   | $2 e^-$                      |
| $\begin{array}{c} CH_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ HC=CH \end{array}$ | $1/3 \begin{array}{c} CH_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ H_2C-CH_2 \end{array} + 2/3 H_3C-CH=CH_2$ | $2 e^-$                      |
| $2 H^+$   | $H_2$  | $2 e^-$                      |



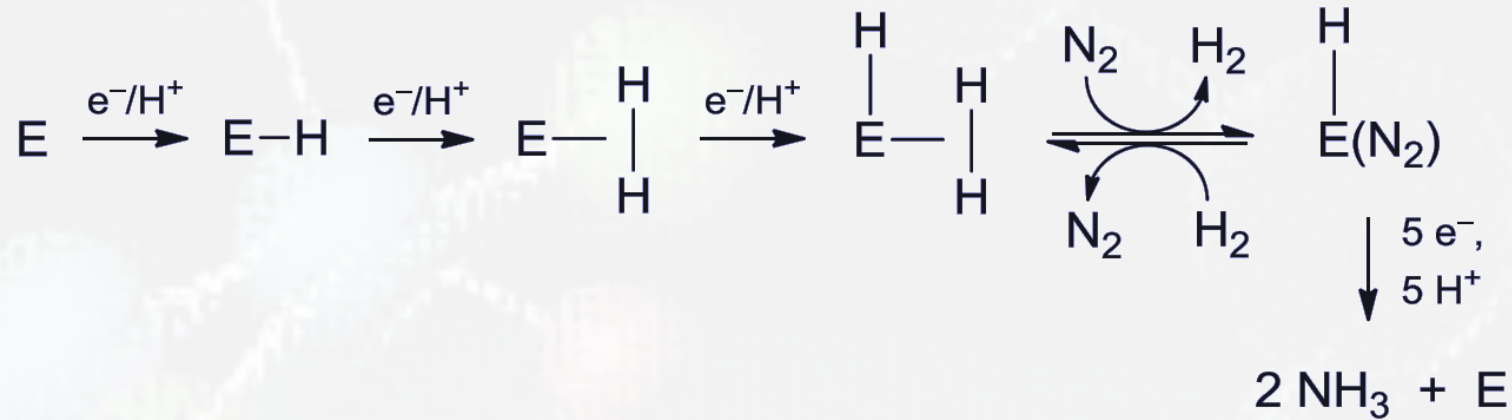
## ***Metaloenzimas no ciclo biológico de N<sub>2</sub>: fixação de nitrogênio dependente de molibdênio***

Mesmo a pressões de N<sub>2</sub> de até 50 bar não impedem a formação de 25% de H<sub>2</sub> por redução equivalente. Portanto, um equilíbrio de deslocamento simples não pode explicar essa evolução de H<sub>2</sub>. Por outro lado, o hidrogênio inibe o processo de fixação de N<sub>2</sub>. Presume-se agora que a redução da enzima E prossegue por meio de etapas de adição de um elétron/H<sup>+</sup> e envolve a ligação de N<sub>2</sub> somente após a adição do terceiro equivalente de redução.



## ***Metaloenzimas no ciclo biológico de N<sub>2</sub>: fixação de nitrogênio dependente de molibdênio***

Mesmo a pressões de N<sub>2</sub> de até 50 bar não impedem a formação de 25% de H<sub>2</sub> por redução equivalente. Portanto, um equilíbrio de deslocamento simples não pode explicar essa evolução de H<sub>2</sub>. Por outro lado, o hidrogênio inibe o processo de fixação de N<sub>2</sub>. Presume-se agora que a redução da enzima E prossegue por meio de etapas de adição de um elétron/H<sup>+</sup> e envolve a ligação de N<sub>2</sub> somente após a adição do terceiro equivalente de redução.

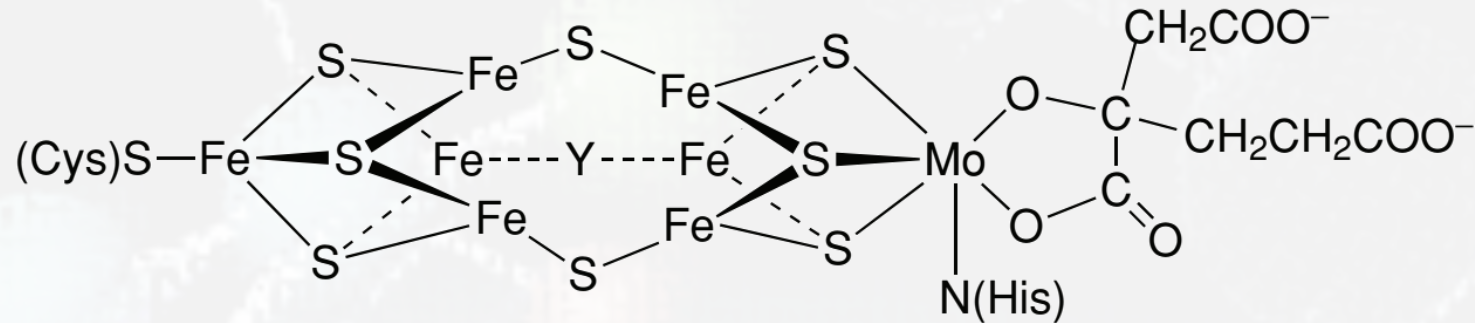


Na maioria dos casos, o hidrogênio assim obtido é imediatamente reoxidado pelas hidrogenases, gerando prótons e energia.

A atividade da nitrogenase também é inibida por um excesso de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pela presença da hidrazina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) e na ausência de componentes inorgânicos essenciais.

## Metaloenzimas no ciclo biológico de $N_2$ : fixação de nitrogênio dependente de molibdênio

A forma de nitrogenase dependente de molibdênio mais amplamente estudada de composição de duas proteínas ( $\sigma_2\beta_2$ ) ( $\gamma_2$ ), com a proteína dimérica especial de ferro ( $\gamma_2$ ), a "dinitrogenase redutase" (cerca de 60 kDa), sendo essencial para função da enzima. Ligado entre as duas subunidades gama desta proteína está um único agrupamento [4Fe-4S], que pode ser reduzido a uma forma paramagnética no potencial fisiologicamente muito negativo de -0,35 V.



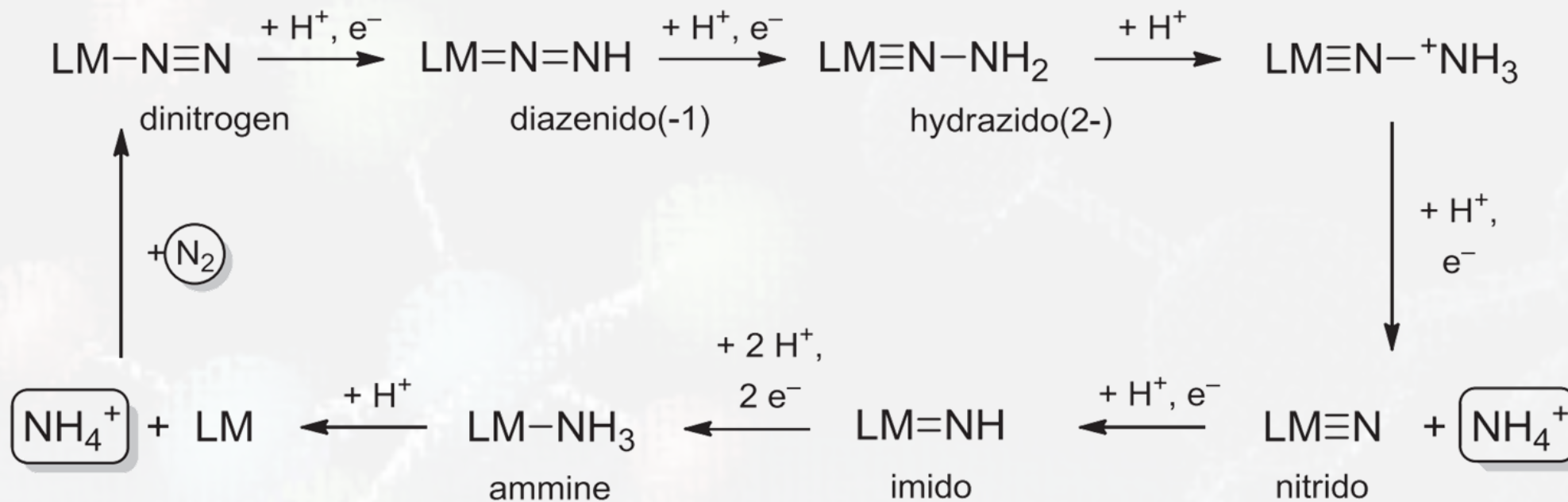
Y: presumably C

O segundo componente, a verdadeira "dinitrogenase" ou "proteína FeMo", é um tetrâmero  $\sigma_2\beta_2$  (220 kDa), que contém dois sistemas Fe/S muito especiais, os clusters P [8Fe-7S] entre subunidades e dois "cofatores FeMo" (FeMoco ou clusters M) nas subunidades, cada um com a composição inorgânica de  $MoFe_7S_9$ .



## Metaloenzimas no ciclo biológico de $N_2$ : fixação de nitrogênio dependente de molibdênio

Um mecanismo de catálise com base em reações modelo de complexos com  $N_2$  coordenado de extremidade não-ponte pode ser formulado:



A adição múltipla de  $e^-/H^+$  antes da fixação real do  $N_2$  resulta no deslocamento de  $H_2$ , seguido pela combinação de  $N_2$  e  $e^-/H^+$  para formar um ligante diazenido,  $HNN^-$ . Este ligante pode reagir com  $e^-/H^+$  para produzir um ligante de hidrazido terminal,  $H_2N-N^{2-}$ .

