

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
SECRETARIA DA EDUCAÇÃO DO ESTADO DA BAHIA**

**PROGRAMA DE FORMAÇÃO CONTINUADA A DISTÂNCIA
CURSO DE COMPLEMENTAÇÃO PARA LICENCIATURA EM
BIOLOGIA, FÍSICA, MATEMÁTICA E QUÍMICA**

QUÍMICA BIOINORGÂNICA

PROFESSOR DR. ADEMIR NEVES

Sumário

Apresentação.....

Capítulo 1

A Química Bioinorgânica e a sua interdisciplinaridade.....

1.1 O que é Química Bioinorgânica?.....

1.2 Funções dos metais nas metaloproteínas.....

1.2 Atividades de Auto-avaliação.....

Capítulo 2

Propriedades das Moléculas Biológicas.....

2.1 Proteínas e os seus Constituintes.....

2.1.a A ocorrência de aminoácidos naturais.....

2.1.b. As proteínas como ligantes.....

2.1.c. Estrutura das proteínas.....

2.2 Ácidos nucleicos e os seus constituintes.....

2.2.a RNA, DNA e os seus blocos estruturais.....

2.3 Atividades de Auto-avaliação.....

Capítulo 3

Transportadores de Oxigênio.....

3.1 Hemoglobina (Hb) e Mioglobina (Mb).....

3.2 Hemeretrina (Hr).....

3.3 Hemocianina (Hc).....

3.4 Atividades de Auto-Avaliação.....

Capítulo 4

Outras Proteínas de Cobre.....

4.1 Tirosinase.....

4.2 Catecol Oxidase.....

4.3 Modelos Estruturais Relevantes para Metaloenzimas de Cobre.....

4.4 Galactose oxidase.....

4.5 Atividades de Auto-Avaliação.....

Capítulo 5

Hidrolases.....

5.1 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs).....

5.1.a. Estruturas Cristalinas por Difração de Raios X.....

5.1.b. Espectroscopia UV-Vis e Raman.....

5.1.c. EPR e Magnetoquímica.....

5.1.d. Espectroscopia Mössbauer.....

5.1.e. Eletroquímica.....

5.1.f. Mecanismo.....

5.1.g Complexos Modelo.....

5.2 Nucleases Químicas.....

5.3. Complexos Modelos para as Hidrolases.....

5.3.a. Reatividade frente ao DNA.....

5.4 Atividades de Auto-Avaliação.....

Capítulo 6

Transferrinas e Metais na medicina.....	
6.1 As Transferrinas e os Modelos sintéticos.....	
6.2 Metais na Medicina	
6.2.a. <i>Introdução</i>	
6.2.b. <i>Rádiofármacos de Gálio e Índio</i>	
6.3 Atividades de Auto-avaliação.....	

Capítulo 7

7.1 Catalases.....	
7.2 Superóxido Dismutases (SOD).....	
7.3 Atividades de Auto-avaliação.....	

Capítulo 8

Métodos Experimentais na Química Bioinorgânica.....	
8.1 Introdução.....	
8.2 Espectroscopia eletrônica.....	
8.3 Espectroscopia Raman.....	
8.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	
8.5 Mössbauer.....	
8.6 Magnetoquímica.....	
8.7 Método de Michaelis-Menten para Tratamento de Dados Cinéticos....	

Apresentação

Da forma mais simples, a Química Bioinorgânica está associada com a investigação da reatividade química dos íons metálicos em sistemas biológicos. Trata-se de uma ciência ampla e relativamente nova, a qual tem atraído pesquisadores dos mais diversos campos de pesquisa. É muito provável, que a sua natureza inter- e multi-disciplinar seja o principal fator que a difere de outras áreas das ciências bioquímicas. Químicos sintéticos, espectroscopistas, eletroquímicos, bioquímicos, físicos, médicos, químicos teóricos e biólogos se encontram nas fronteiras da química e biologia e são desafiados por problemas excitantes os são investigados pelas mais diversas técnicas disponíveis nos dias atuais. No entanto, é através da elucidação dos princípios químicos que tais estudos estão direcionados uma vez que, as leis que governam a química de moléculas biológicas, são as mesmas que aquelas que definem as propriedades químicas e físicas de típicos materiais e moléculas orgânicas e inorgânicas. Por essa razão, o entendimento dos diversos princípios fundamentais de química são de grande utilidade para se poder estudar as complicadas moléculas biológicas.

Neste texto, nos Capítulos 1 e 2 são abordados os aspectos fundamentais relacionados com as propriedades das principais moléculas biológicas, a Química Bioinorgânica e a sua interdisciplinariedade além da introdução dos aspectos mais relevantes dos modelos sintéticos nessa área. No capítulo 3 abordamos as metaloproteínas transportadoras de oxigênio; certamente um dos processos mais importantes do nosso planeta. Uma descrição das mais importantes metaloenzimas de cobre, as suas funções catalíticas e alguns modelos está descrita no Capítulo 4. No Capítulo 5, nos concentramos de forma detalhada, ao estudo das hidrolases incluindo as fosfatases ácidas púrpuras e as nucleases químicas e as suas possíveis utilizações em processos de clivagem hidrolítica do DNA. No Capítulo 5, também abordamos o estudo detalhado de complexos modelos e as suas importâncias no contexto das metaloproteínas. Nos Capítulos 6 e 7 são relatadas as transferrinas, catalases, superóxido dismutase e a introdução de elementos inorgânicos não-naturais como drogas em potencial atualmente utilizadas na medicina. O Capítulo 8 trata de uma revisão dos métodos físico-químicos experimentais e seus princípios os quais são comumente utilizados na química bioinorgânica. Finalmente, em se tratando de uma área relativamente nova dentro das ciências exatas e naturais, nos preocupamos em despertar o interesse, a curiosidade, o espírito científico e as contribuições do leitor, através da resolução de atividades de auto-avaliação apresentadas em cada um dos capítulos estudados.

Prof. Dr. Ademir Neves

Capítulo 1

A Química Bioinorgânica e a sua interdisciplinaridade

Objetivos

- *Identificar a Química Bioinorgânica e estabelecer conexões nos seus mais diversos aspectos inter- e multi-disciplinares*

1.1 O que é Química Bioinorgânica?

De uma forma geral, a química bioinorgânica representa uma área de pesquisas que vem crescendo rapidamente nas últimas duas décadas. Apesar do seu título, trata-se de uma área interdisciplinar e que desta forma contempla diversas disciplinas de química e biologia. A Fig.1.1 ilustra as principais disciplinas em conexão com a química bioinorgânica.

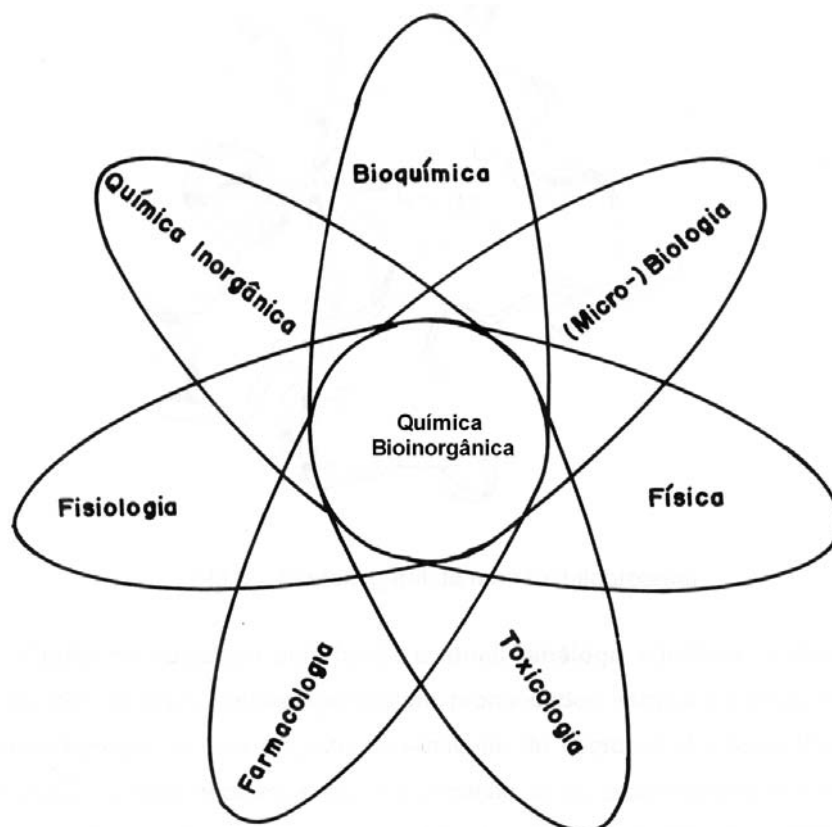


Fig. 1.1 A química bioinorgânica e a sua interdisciplinaridade.

A seguir estão descritas algumas disciplinas e as suas principais contribuições para a química bioinorgânica:

Física – Métodos de detecção e caracterização;

Agricultura e Ciências Nutricionais – Efeito dos elementos inorgânicos e as suas interdependências mútuas;

Farmacologia – interação entre drogas e materiais inorgânicos;

Medicina - Diagnóstico e e terapias;

Toxicologia e Ciências Ambientais – Toxicidade de compostos inorgânicos e estudo do problema das concentrações a serem utilizadas.

Embora a biologia normalmente esteja associada com a química orgânica, os elementos inorgânicos também são essenciais para os processos vivos. Alguns desses processos incluem respiração, a maioria dos metabolismos, fixação de nitrogênio, fotossíntese, crescimento, contração muscular, neurotransmissores e proteção contra agentes tóxicos e mutagênicos. Metais não-naturais também tem sido introduzidos na biologia humana em diagnósticos e como drogas. A Fig. 1.2 e a Tab. 1.2 listam os elementos inorgânicos essenciais juntamente com algumas das suas funções e sintomas pela deficiência em biologia.

I	II	elementos de transição do bloco d										III	IV	V	
Na	Mg														
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn				
		Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd				
		La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg				

Fig.1.2 Elementos inorgânicos selecionados em química bioinorgânica. Elementos naturais em cores; elementos utilizados como drogas em cinza.

Tab. 1.1 Funções biológicas dos íons metálicos e sintomas pela falta de alguns elementos.

Funções Biológicas de alguns metais selecionados

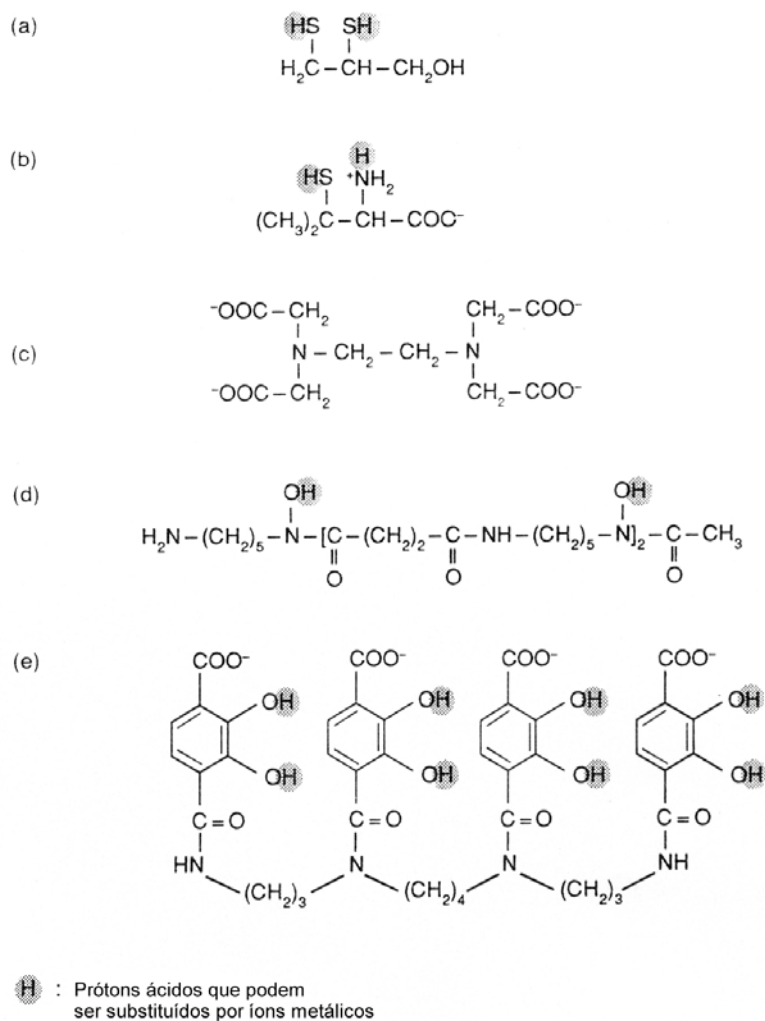
Metal	Função
Sódio	Transportador de cargas; balanço osmótico
Potássio	Transportador de cargas; balanço osmótico
Magnésio	Estrutura; hidrolase; isomerase
Cálcio	Estrutura; transportador de cargas
Vanádio	Fixação de nitrogênio; oxidase
Cromo	Possivelmente? Tolerância à glicose
Molibdênio	Fixação de nitrogênio; oxidase; transferência de OXO
Tungstênio	dehidrogenase
Manganês	Fotossíntese, oxidase, catalase, SOD
Ferro	Oxidase; fosfatase; hidrolase; Transporte e armazenamento de O ₂ ; Transferência de elétrons
Cobalto	Oxidase; Transferência de grupos alquila
Cobre	Oxidase; transporte de O ₂ ; transferência de elétrons
Zinco	Estrutura; hidrolase.

Sintomas Característicos pela Deficiência Elementos Químicos em Humanos

Elemento deficiente	Sintomas Típicos
Ca	Crescimento retardado do esqueleto
Mg	Paralisia de certos músculos
Fe	Anemia, desordem do sistema imunológico
Zn	Danos na pele, impedimento do crescimento, Maturação sexual retardada
Cu	Enfraquecimento das artérias, desordem no fígado, anemia secundária
Mn	Infertilidade, diminuição do crescimento do esqueleto

Mo	Retardamento do crescimento celular, propensão à cáries,
Co	Anemia perniciosa
Ni	Crescimento depressivo, dermatite
Cr	Sintomas de diabete
Si	Desordem de crescimento do esqueleto
F	Cáries
I	Tiróide, metabolismo retardado
Se	Enfraquecimento dos músculos
As	Crescimento diminuído

É importante mencionar que, não existem apenas os sintomas por **deficiência** de determinados elementos mas também os efeitos causados pelo excesso dos mesmos, como resultado de excreção insuficiente ou absorção em demasia. O tratamento de tais envenenamentos pode ser feito através do uso de antagonistas ou pela terapia dos quelatos. Na Tab. 1.2 são apresentados alguns ligantes comercialmente disponíveis utilizados em processos de desintoxicação de metais. As estruturas desses ligantes estão representadas a seguir:



Tab. 1.2. Ligantes quelatos utilizados em processos de desintoxicação

ligante	nome trivial	íons metálicos
(a) 2,3-dimercapto-1-propanol	dimercaprol	Hg ²⁺ , As ³⁺ , Sb ³⁺ , Ni ²⁺
(b) Ácido D-amino-3-mercaptop-3-metilbutírico	D-penicilamina	Cu ²⁺ , Hg ²⁺
(c) Etilenodiaminatetraacetato	EDTA	Ca ²⁺ , Pb ²⁺
(d) Dederrioxamina	Desferal	Fe ³⁺ , Al ³⁺
(e) 3,4,3-LICAMC		Pu ⁴⁺

No tratamento através de agentes quelantes, devemos ser extremamente criteriosos na escolha dos mesmos para que haja seletividade em relação aos metais a serem eliminados. Para tanto, existem alguns princípios básicos os quais devem ser levados em conta:

- 1) O tamanho dos metais a serem coordenados;
- 2) O favorecimento na coordenação de determinados átomos: **S** para metais moles, **N** especialmente para Cu^{2+} e o **O** para centros duros;
- 3) Agentes quelatos adequados devem formar complexos cineticamente e termodinamicamente estáveis;
- 4) Os complexos formados devem ser facilmente e rapidamente excretados através da urina (presença de grupos hidroxila hidrofílicos).

Conforme pode ser visualizado na Fig. 1.3, metaloproteínas podem ser consideradas de forma simples, como sendo grandes complexos de coordenação. Assim sendo, a caracterização de metaloproteínas através de métodos físico-químicos pode estar em conexão direta com os estudos realizados pelos químicos inorgânicos em espécies de baixo peso molecular. No entanto, é importante mencionar que o estudo cristalográfico de metaloproteínas, sob hipótese nenhuma pode mostrar a precisão usualmente associada e esperada para moléculas de baixo peso molecular. Esta limitação no estudo dos sistemas biológicos, tem conduzido ao estudo de *análogos* ou *modelos* sintéticos para as metaloproteínas.

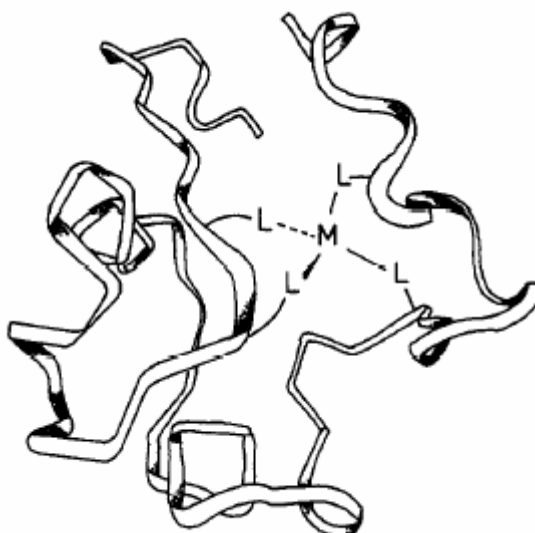


Fig. 1.3. Modelo geral de uma metaloproteína.

Conforme postulado por Reed, o termo “**análogo sintético**” é utilizado para aqueles complexos os quais apresentam propriedades estruturais similares àquelas das metaloproteínas com respeito ao ambiente de coordenação do centro metálico, (sítio ativo), a sua geometria de coordenação e as propriedades físico-químicas. “**Modelos sintéticos**” na maioria das vezes, são capazes de mimetizar apenas certas propriedades das metaloenzimas, mas certamente podem ser extremamente úteis na elucidação dos centros ativos das mesmas.

De acordo com o estabelecido por Ibers e Holm, a utilização de análogos sintéticos se baseia na premissa de que a química do sítio de ligações do metal, depende essencialmente do imediato ambiente de coordenação do íon metálico. Para a maioria das metaloproteínas, o imediato ambiente de coordenação consiste de átomos doadores pertencentes à cadeias laterais de aminoácidos conforme pode ser visualizado na Fig. 1.3.

A estratégia utilizada na síntese de compostos biomiméticos normalmente segue o procedimento de acordo com as etapas mostradas na Tab. 1.2.

Tab. 1.2. A estratégia utilizada para mimetizar o sítio ativo de metaloenzimas.

1	Isolamento e purificação da metaloenzima
2	Determinação detalhada das propriedades físicas e caracterização preliminar dos componentes do sítio ativo
3	Projeção dos ligantes
4	Síntese e caracterização de compostos modelo
5	Comparação das propriedades físicas dos compostos modelo com aquelas da metaloenzima purificada
6	Análise estrutural dos compostos modelo
7	Investigação da reatividade química dos modelos

Quando se tiver algumas informações acerca da estrutura do sítio ativo da metaloproteína, incluindo no mínimo, caracterizações espectroscópicas, o estágio de projeção do tipo de ligante e a geometria a ser adotada em torno do centro metálico é essencial. Após a realização da síntese e caracterização do composto, as propriedades do análogo sintético com aquelas apresentadas pela proteína são comparadas. Se existirem poucas similaridades pode-se concluir que o modelo é pobre e retorna-se ao estágio de projeção. Por outro lado, se o modelo for bom, ou seja, as propriedades espectroscópicas e físicas do modelo e da metaloproteína são similares, então torna-se importante a

determinação da estrutura do modelo. Dados estruturais precisos juntamente com informações espectroscópicas normalmente são extremamente úteis na elucidação da estrutura de proteínas ainda não bem caracterizadas. De posse de um bom análogo estrutural, iniciam-se os estudos de reatividade química.

1.2 Funções dos metais nas metaloproteínas

Normalmente, os metais são encontrados como constituintes naturais nas proteínas. Na verdade, a natureza aprendeu a utilizar as propriedades especiais dos metais para realizar uma ampla variedade de funções associadas com sistemas vivos. Metaloproteínas que realizam funções catalíticas são denominadas de *metaloenzimas*; elas constituem uma classe especial e serão estudadas em detalhes no decorrer desse texto.

1.3 Atividades de Auto-avaliação

- 1) O que é **Química Bioinorgânica**?
- 2) Estabeleça a diferença entre *Modelo* e *Análogo* sintético.
- 3) Quais as conexões entre Química Orgânica e Química Inorgânica dentro da Química Bioinorgânica?
- 4) Toda metaloenzima é também uma metaloproteína porém nem toda metaloproteína é uma metaloenzima. Explique.
- 5) Quais as principais informações necessárias acerca de uma metaloproteína, quando se quer elaborar um modelo ou um análogo sintético?
- 6) O EDTA é um ligante hexadentado. Represente a estrutura para o íon complexo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{3-}$. Esse complexo pode ter algum isômero geométrico?

7) Íons metálicos em excesso podem causar processos de intoxicação por ex. por se ligarem num sítio não-apropriado, competindo dessa forma, com outros íons metálicos benéficos por esse sítio ou ainda causar reatividades indesejadas do metal quando esse não estiver ligado na sua forma normal. O desferal é amplamente utilizado em processos de intoxicação por Fe^{3+} . Considerando que o complexo formado possui somente átomos de oxigênio ligados na primeira esfera de coordenação, represente a estrutura tridimensional mais provável para esse complexo.

Capítulo 2

Propriedades das Moléculas Biológicas

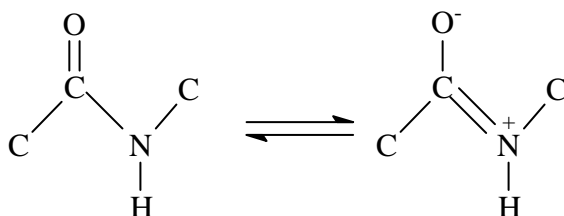
Objetivos

- Conhecer os mais diversos aspectos acerca das propriedades das moléculas biológicas: a) proteínas e os seus constituintes; b) ácidos nucléicos e os seus constituintes

2.1 Proteínas e os seus Constituintes

2.1.a A ocorrência de aminoácidos naturais.

As proteínas são compostas de 20 aminoácidos essenciais, muitos dos quais possuem átomos doadores adequados para coordenação com íons metálicos. As estruturas dos aminoácidos de cadeias laterais em pH 7 são apresentadas na Fig. 2.1. Os valores de pKa's estão apresentados na Tab. 2.1 Como se sabe a partir da química de coordenação, a coordenação desses sítios a íons metálicos pode diminuir os valores dos pKa's efetivos de forma significativa. Proteínas consistem de cadeias de aminoácidos os quais se juntam através de ligações peptídicas. Essas ligações peptídicas são essencialmente unidades planares as quais usualmente existem na configuração *trans* conforme mostrado abaixo.



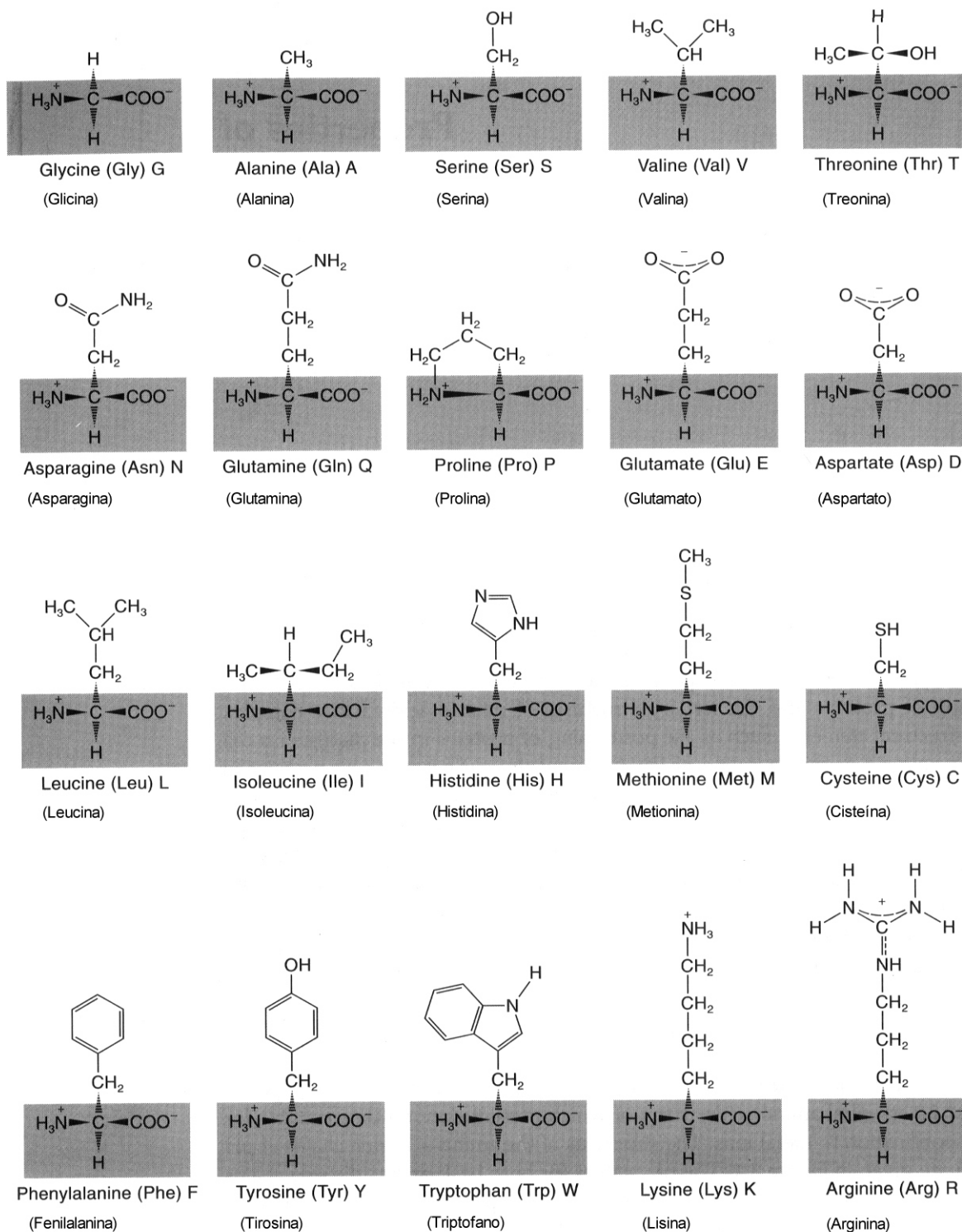


Fig. 2.1. Estruturas dos vinte aminoácidos e a representação dos códigos de uma e três letras.

Tab. 2.1 Valores de pK's dos aminoácidos de cadeias laterais

Aminoácido	pK
Arginina	12,48
Ácido aspártico	3,65
Cisteína	8,35
Ácido glutâmico	4,25
Histidina	6,00
Lisina	10,79
Tirosina	10,13
α -COOH	-2,2
α -NH ₃ ⁺	-9,5

Os resíduos de aminoácidos nas proteínas, são numerados partindo-se do primeiro resíduo de aminoácido terminal. Cada aminoácido é representado por uma única letra código ou na forma usual, através de três letras (por ex. histidina = His ou H; ácido aspártico = Asp ou D), conforme mostrado na Fig.2.1. O código de uma letra passou a ser utilizado de maneira mais freqüente devidos aos avanços na tecnologia de sequenciamento do DNA, o qual através da aplicação do código genético tem expandido de forma significativa, o número de seqüências de proteínas.

2.1.b. As proteínas como ligantes

Os aminoácidos que normalmente funcionam como ligantes e os seus respectivos modos de coordenação estão ilustrados na Fig. 2.2. Os mais importantes são o tiolato da cisteína, o imidazol da histidina, os carboxilatos dos ácidos aspártico e glutâmico e o phenolato do grupo tirosina. Com exceção da tirosina, tem-se observado que os demais podem atuar como ligantes ponte entre dois íons metálicos ou como ligantes terminais de um íon simples.

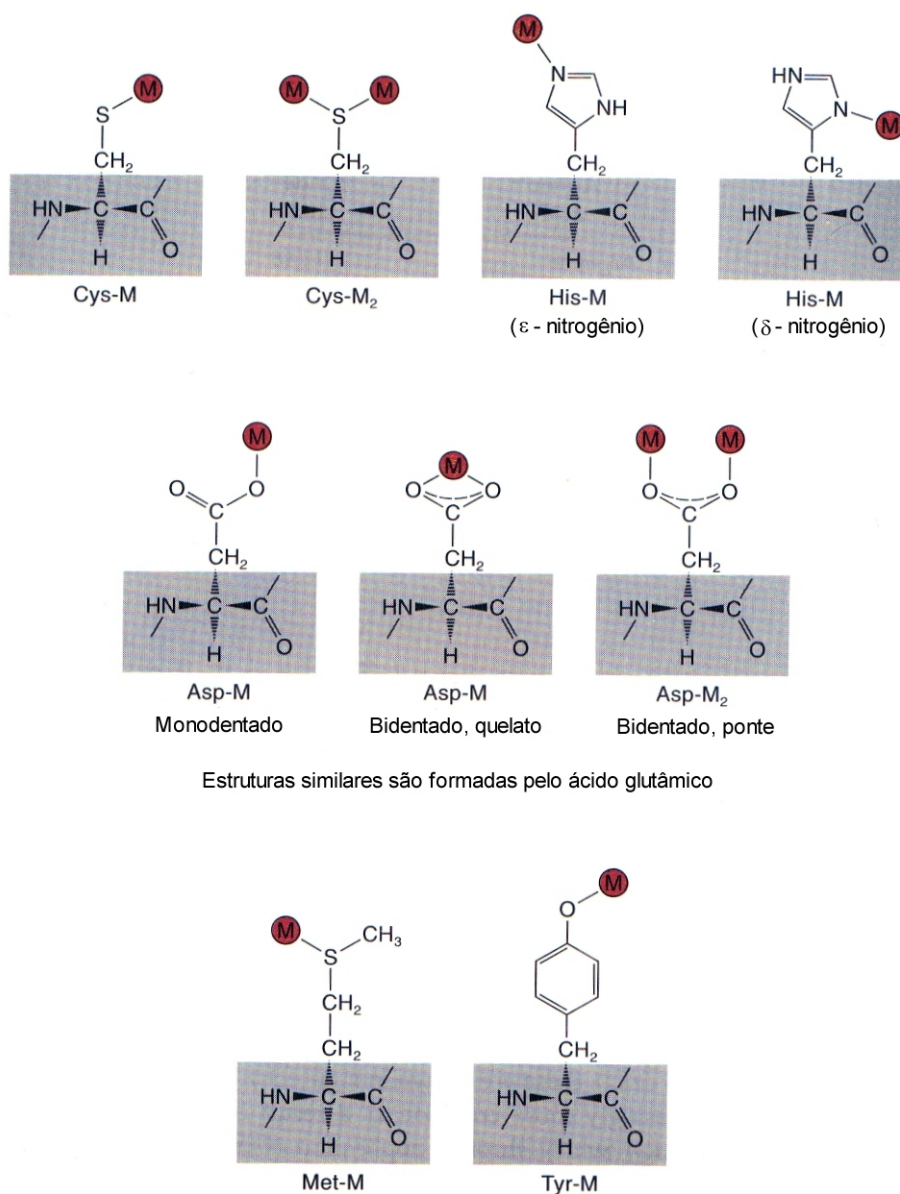


Fig. 2.2. Modos de ligação dos restos de aminoácidos aos ions metálicos

Além dos ligantes disponíveis nas cadeias laterais dos aminoácidos, os metais também podem se ligar a grupos carbonila dos peptídeos, a átomos de nitrogênio desprotonados da ligação peptídeo e aos grupos amino N-terminal e carboxil C-terminal.

2.1.c. Estrutura das proteínas.

Nos sistemas vivos existe um grande número de proteínas diferentes que são todas essenciais e formam parte dos tecidos, atuam como catalisadores (**enzimas**) além de outros papéis importantes como por exemplo se ligar a outras moléculas como a hemoglobina.

A orientação dos ligantes doadores numa metaloproteína é completamente dependente da sua estrutura tri-dimensional. A dobradura de uma cadeia polipeptídica numa única estrutura tri-dimensional depende de uma série de fatores. Os mais importantes são: o empacotamento das superfícies hidrofóbicas, usualmente no interior da proteína, para evitar a interação com solventes mais polares do meio; a formação de ligações de hidrogênio e interações iônicas específicas; e algumas vezes a coordenação de cadeias laterais de aminoácidos a centros metálicos. A estrutura de uma proteína pode ser descrita em 4 níveis. A **estrutura primária** se refere a seqüência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (-CO-NH-) na cadeia polipeptídica (Fig. 2.3). Essas ligações são susceptíveis a processos de hidrólise por ácidos e bases fortes e hidrólise enzimática.

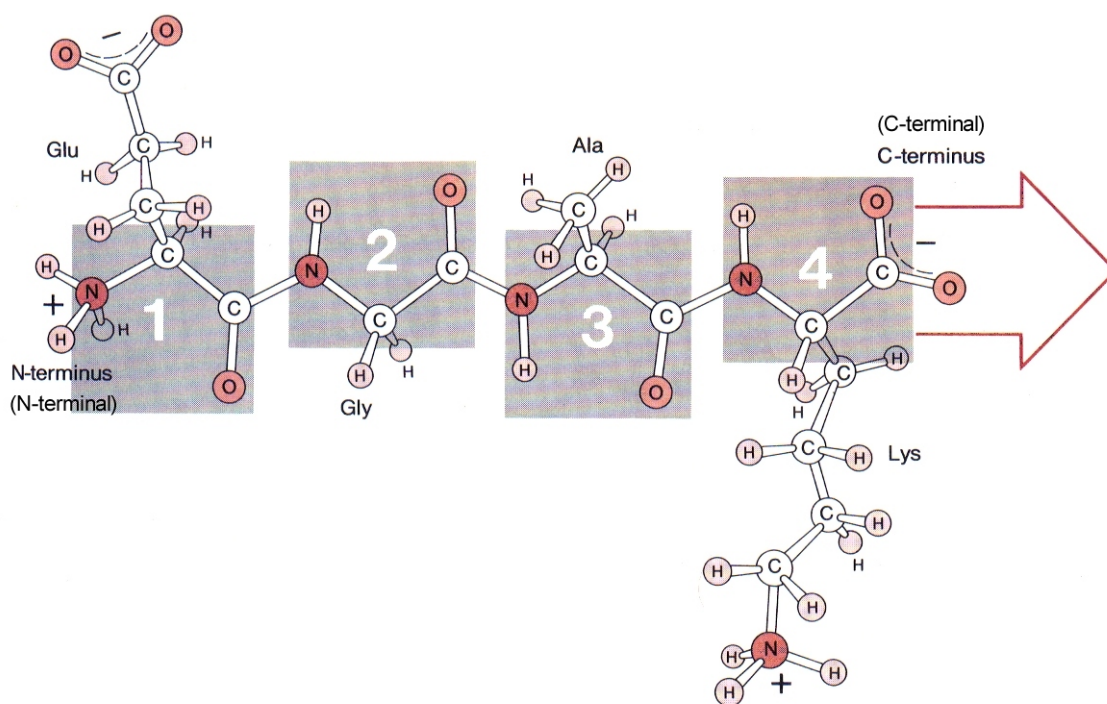


Fig. 2.3. Estrutura primária de uma proteína. A numeração dos aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica inicia no N-terminus ao C-terminus.

A *estrutura secundária* está relacionada com a conformação da cadeia polipeptídica, a disposição de α -hélices, β -camadas e disposição ao acaso (normalmente ligações de hidrogênio de grupos NH e CO) conforme mostrado na Fig. 2.4.

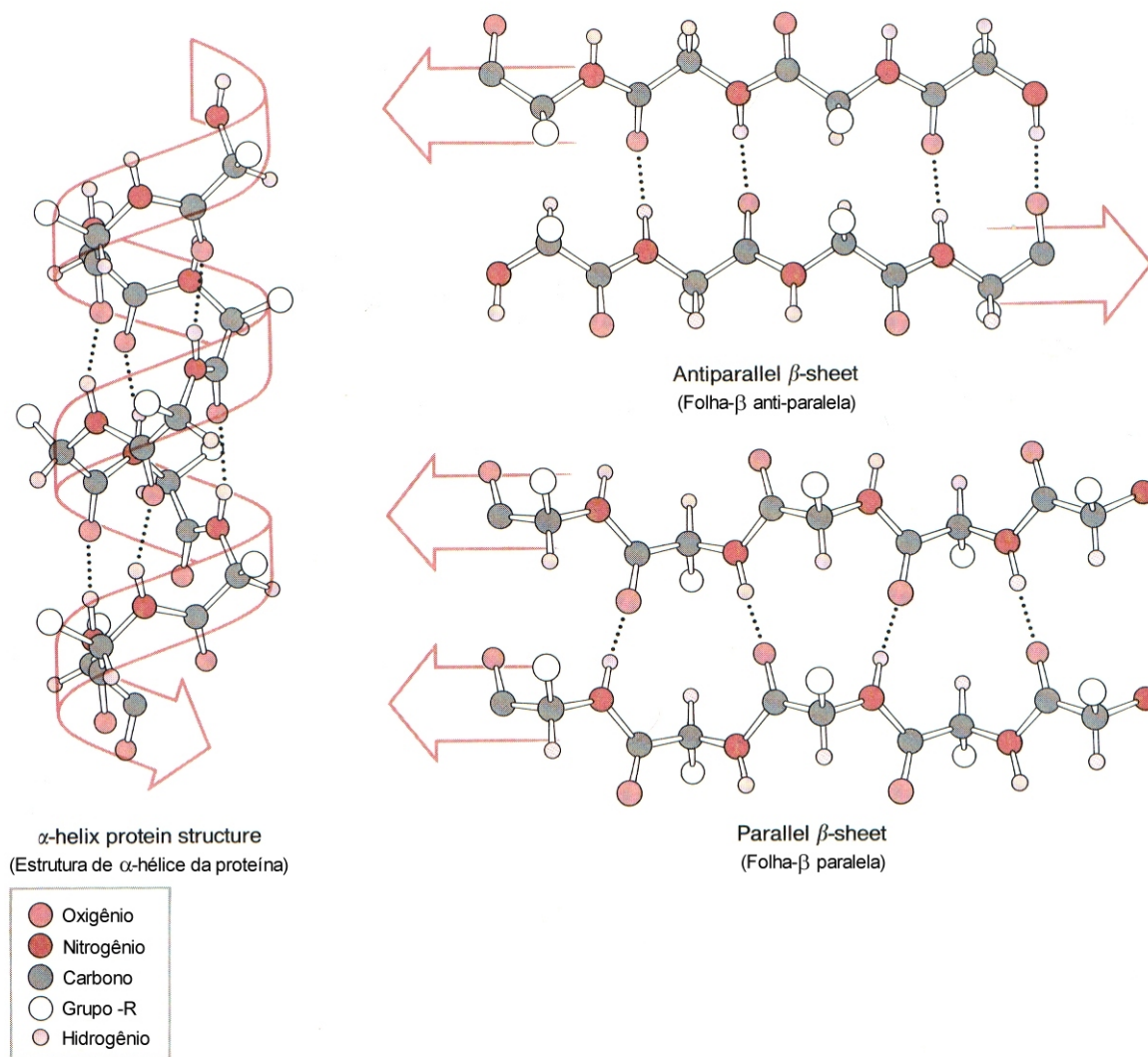


Fig. 2.4. Estrutura secundária de uma proteína.

A *estrutura terciária* se refere a distribuição tri-dimensional do conjunto da proteína a qual é mantida por diversas forças (ligações covalentes, forças eletrostáticas, ligações de coordenação a íons metálicos, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals).

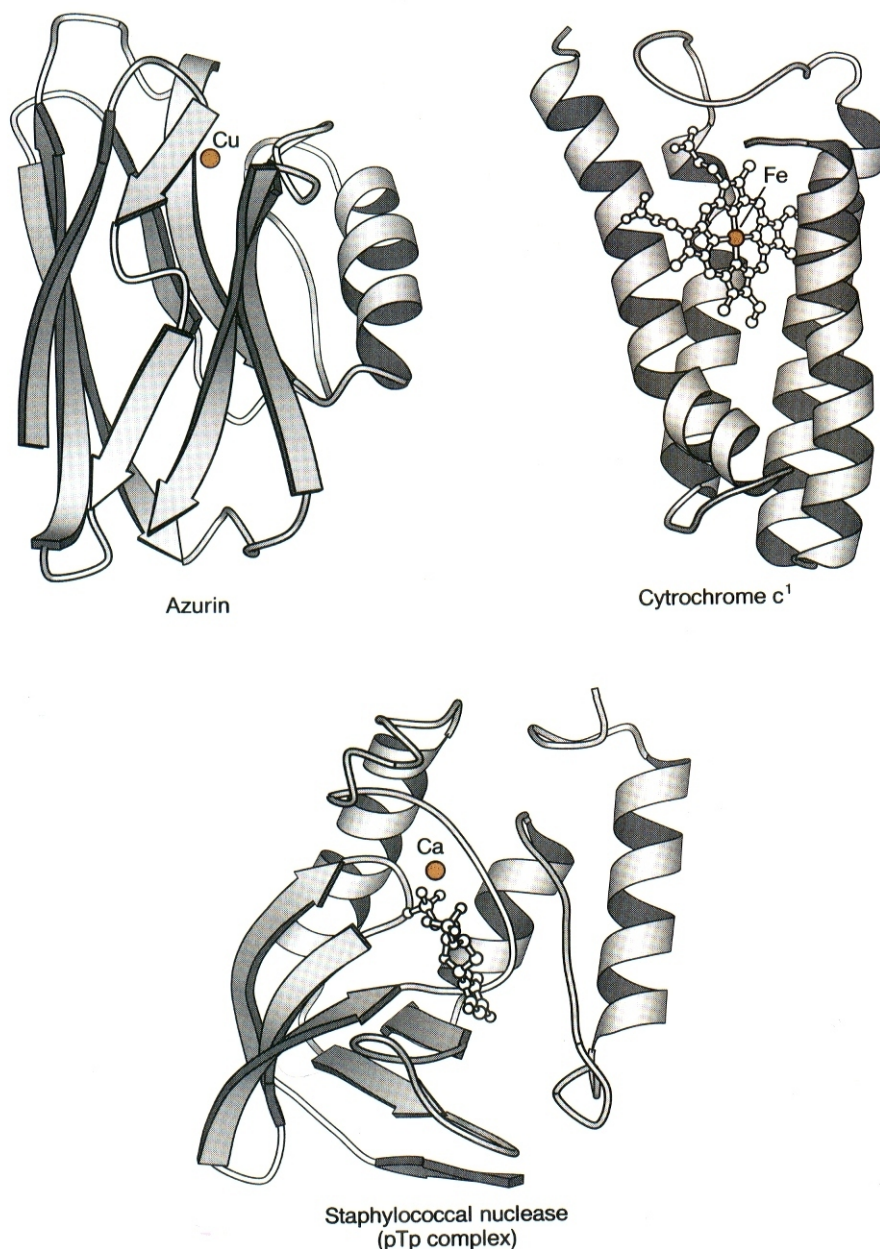


Fig. 2.5. Estrutura terciária de uma proteína.

Finalmente, a **estrutura quaternária** (Fig. 2.6) se refere a junção de diferentes cadeias polipeptídicas para formar unidades maiores. Também pode-se dizer que representa a união das subunidades (cadeias polipeptídicas). Algumas proteínas possuem mais de duas subunidades como por exemplo, hemoglobina (4) e heme-trina (8). A estrutura quaternária de uma proteína pode ser essencial para a sua função e algumas vezes pode influenciar profundamente às propriedades estruturais no sítio de ligação de metal e vice-versa.

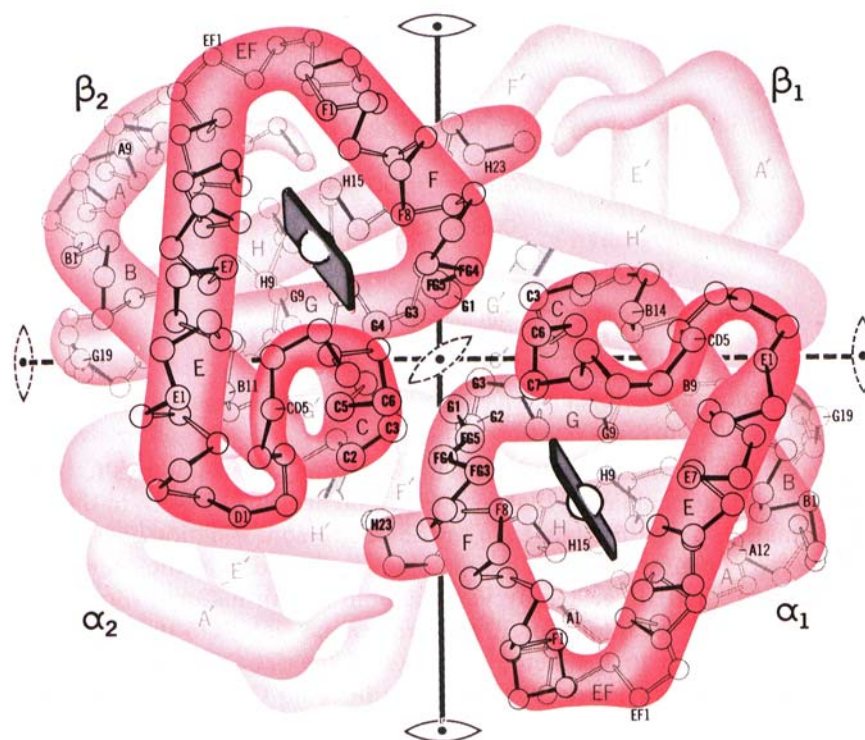


Fig. 2.6. Estrutura quaternária da hemoglobina.

2.2 Ácidos nucleicos e os seus constituintes

2.2.a RNA, DNA e os seus blocos estruturais

Ácidos nucleicos são polímeros constituídos de ribonucleotídeos ou deoxiribonucleotídeos no RNA e DNA, respectivamente. Conforme apresentado na Fig.2.7, grupos do tipo fósforo-diésteres se unem a resíduos adjacentes para formar unidades poliméricas açúcar-fosfato.

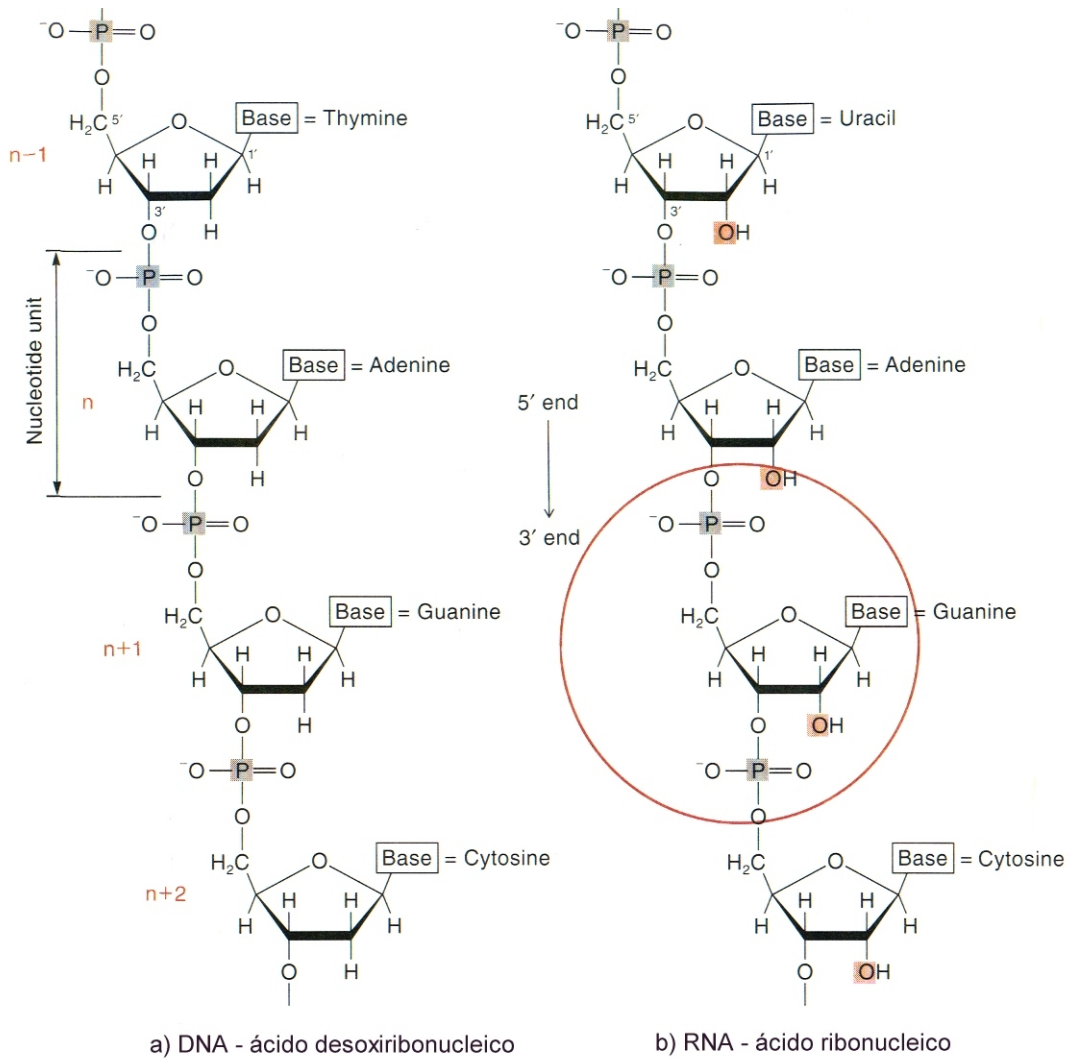


Fig. 2.7. Estruturas das unidades fosfodiéster do DNA e RNA.

Ligado a cada açúcar, através de ligações glicosídicas tem-se uma das cinco bases nucleotídeas, as purinas (adenina e guanina) e as pirimidinas, citosina, timina (para o DNA) ou uracil (para o RNA). Ao contrário das junções planares nas proteínas, as ligações fósforo-diéster nos ácidos nucleicos podem assumir uma variedade de conformações, definidas pelos ângulos torsionais conforme mostrado na Fig. 2.8. As conformações podem se tornar mais complexas a partir dos ângulos de torção dos anéis dos açúcares. Duas estruturas básicas prevalecem: uma encontrada no RNA, onde o átomo de C3' se encontra do mesmo lado do plano definido por C4'-O-C1' e a outra, muitas vezes encontrada no DNA, onde o átomo C2' se encontra em posição *endo* ao C5'.

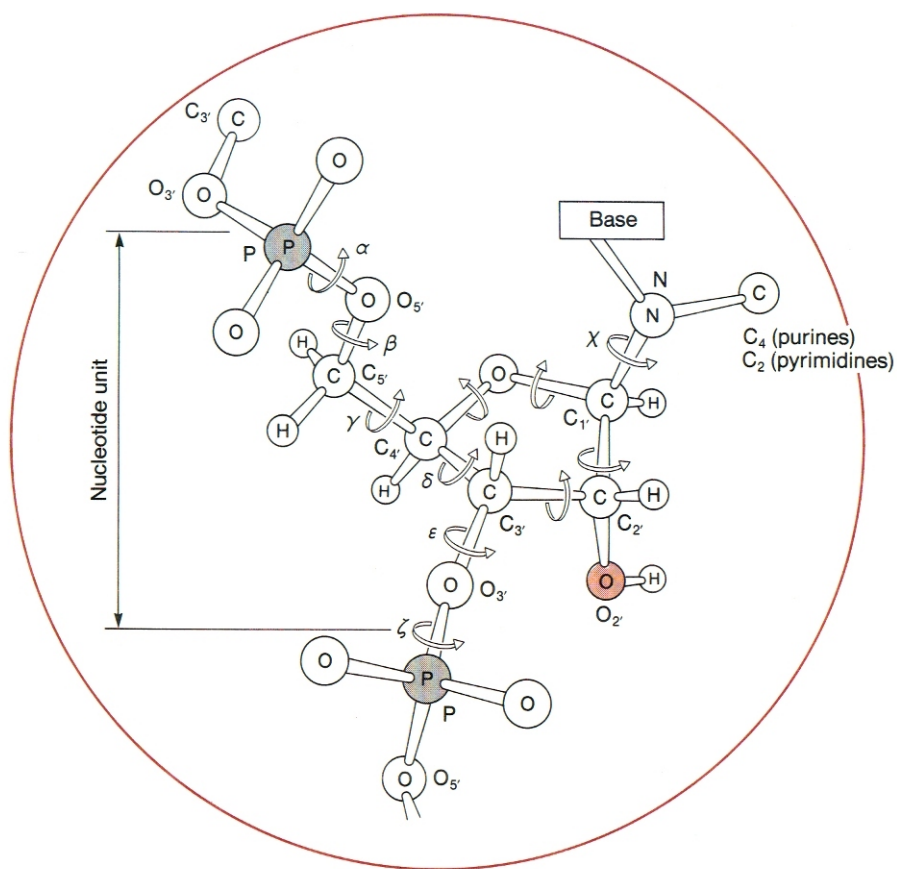


Fig. 2.8. Unidade de nucleotídeo mostrando os ângulos torsionais utilizados para descrever a sua conformação.

Além disso, as bases podem adotar conformações *syn* e *anti* em relação ao glicosídeo (Fig. 2.9). Essas mudanças aparentemente sutis no açúcar podem ter consequências dramáticas sobre a estrutura terciária, e portanto sobre as propriedades do biopolímero se ligar a centros metálicos.

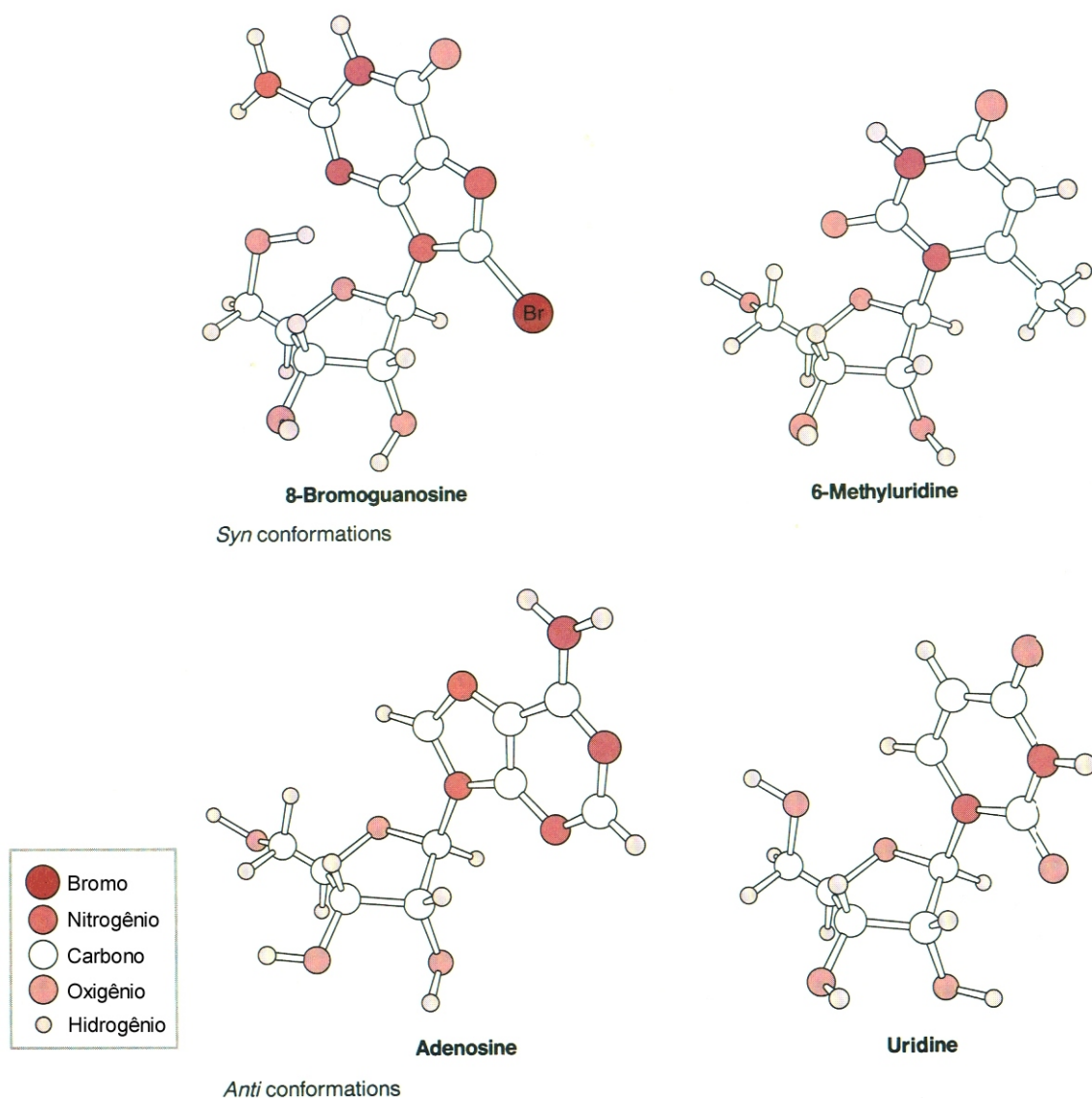


Fig. 2.9. Estruturas representativas de nucleosídeos e derivados ilustrando as conformações *syn* e *anti* com respeito a ligação glicosídica.

A unidade contendo somente o açúcar e a base, é denominada de *nucleosídeo* enquanto os *nucleotídeos* contêm grupos fosfato 5' ou 3'. Exemplos de nucleotídeos incluem o **ATP** (adenosina trifosfato), **NAD** (nicotinamida adenina dinucleotídeo), **FMN** (flavina mononucleotídeo) e **FAD** (flavina adenina dinucleotídeo) conforme mostrado na Fig.2.10. Esses compostos são essenciais para os sistemas vivos por atuarem como portadores de energia (ATP) e como coenzimas de proteínas enzimáticas que intervêm em processos redox ou de desidrogenação (NAD, FMN, FAD).

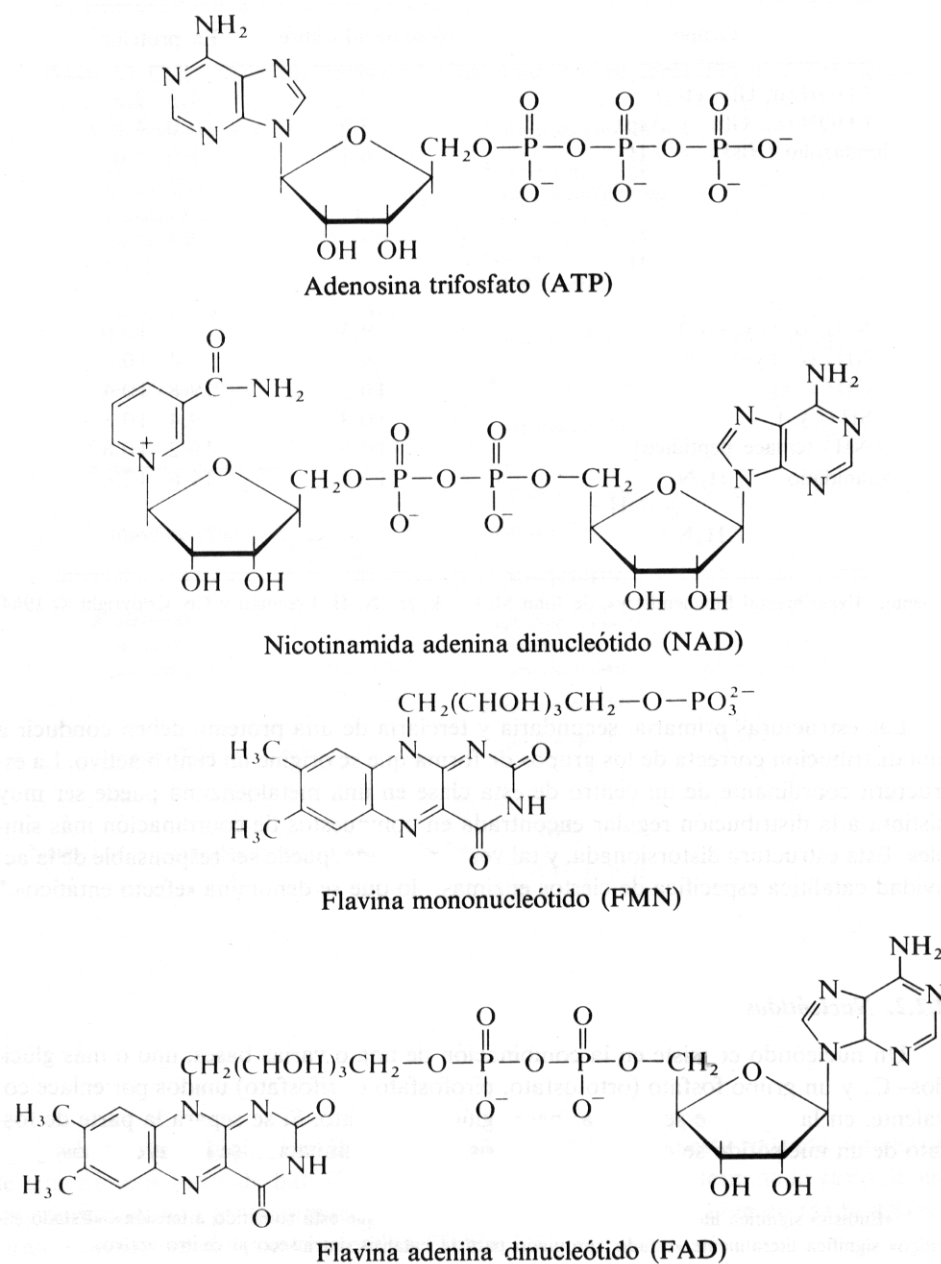


Fig. 2.10. Estruturas dos nucleotídeos mais importantes.

Na Fig. 2.11 estão desenhadas as estruturas dos cinco nucleosídeos, as numerações de seus átomos e as interações nos pares de bases de **Watson-Crick**. Os pares de bases são responsáveis pela ligação de duas fitas de DNA para formar o DNA dupla-hélice e principalmente pela formação da estrutura secundária do RNA. Um esquema alternativo encontrado algumas vezes são os pares de bases de **Hoogsteen**, o qual também é apresentado na Fig. 2.11.

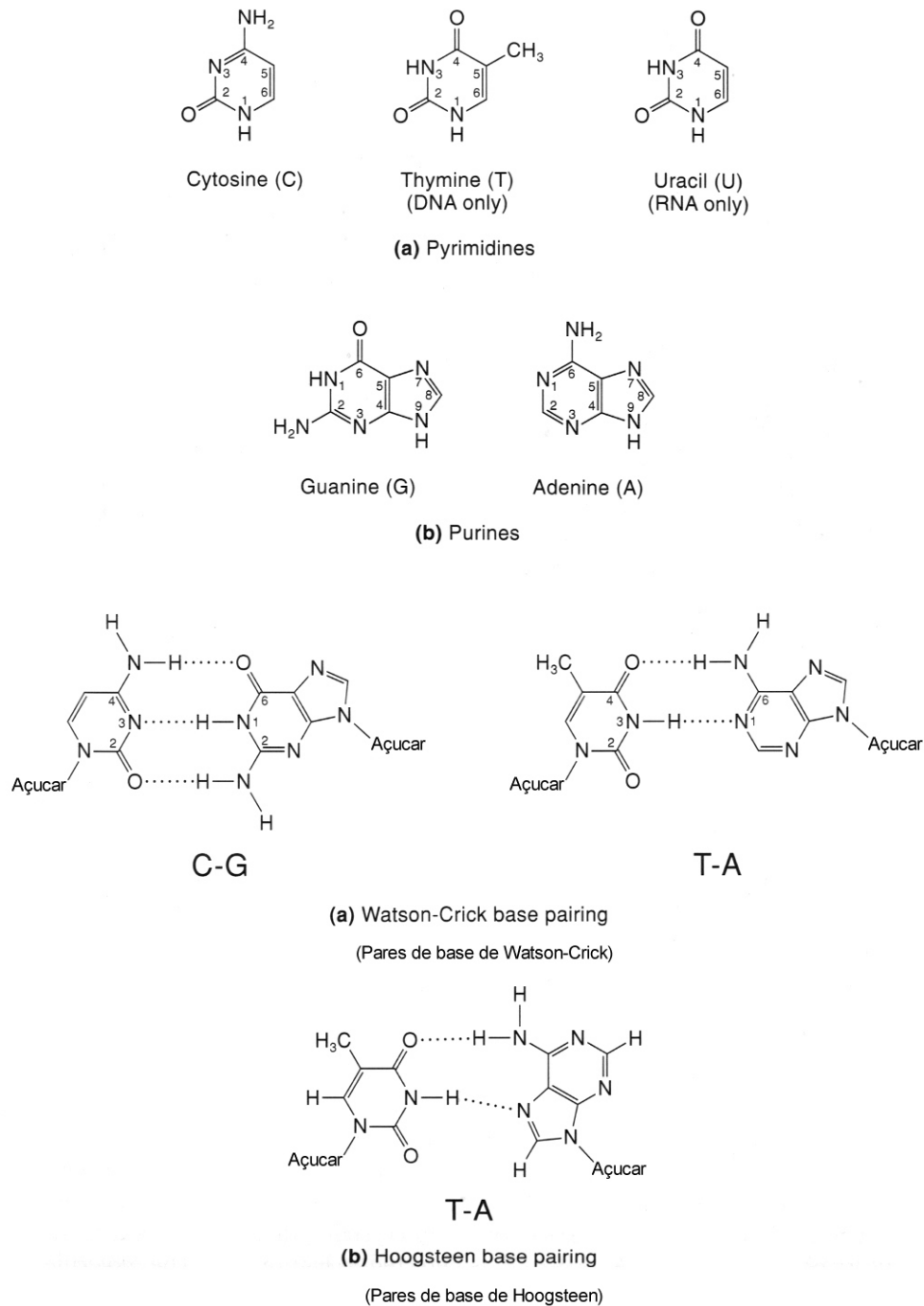


Fig. 2.11. Esquemas dos pares de bases que ocorrem nos ácidos nucléicos.

O DNA mais comum e mais bem descrito é o dupla-fita, o qual é formado por ligações de hidrogênio entre pares de bases específicas (Watson-Crick). Duas unidades açúcar-fosfato se retorcem numa conformação helicoidal em torno do pacote de par de bases central, gerando um *sulco maior* e um *sulco menor*. Esta unidade assim formada, pode adotar diferentes conformações conforme pode

ser visualizado na Fig 2.12. Tipicamente, o DNA assume a conformação B, a qual pode ser convertida para Z-DNA sob condições de elevadas concentrações de sais ou na presença de solventes orgânicos. A conformação Z é particularmente favorável em seqüências contendo nucleotídeos GC alternados. A conformação A normalmente está associada com o RNA dupla-fita ou com híbridos do tipo RNA-DNA. As conformações das forma A e B são hélices "direita" (right-handed) enquanto que a forma Z é "esquerda" (left-handed).

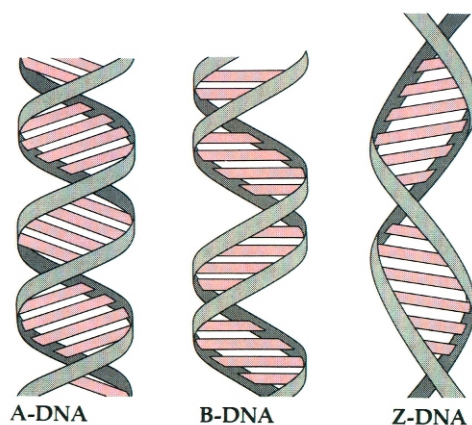


Fig. 2.12. Conformações das forma A, B e Z do DNA.

Os ácidos ribonucléicos são classificados de acordo com as suas funções na célula. O RNA mensageiro, mRNA, transfere informações genéticas a partir do DNA no núcleo para os ribossomas no citoplasma, onde ocorre a síntese das proteínas. Um constituinte dos ribossomas é o RNA ribossomal, rRNA, enquanto que o RNA de transferência, tRNA, liga moléculas de amino-ácidos ao seu término 3', transportando-as para os ribossomas, onde então são transferidas para a cadeia protéica.

Os sítios de coordenação dos nucleosídeos são mostrados na Fig. 2.13 e consistem principalmente dos nitrogênios endocíclicos. Os pares eletrônicos livres dos nitrogênios exocíclicos estão amplamente deslocalizados sobre o anel por ressonância, e assim esses grupos tem pequena capacidade de se coordenarem aos íons metálicos a menos que se encontrem na forma desprotonada RNH^- o que gera forte nucleófilos.

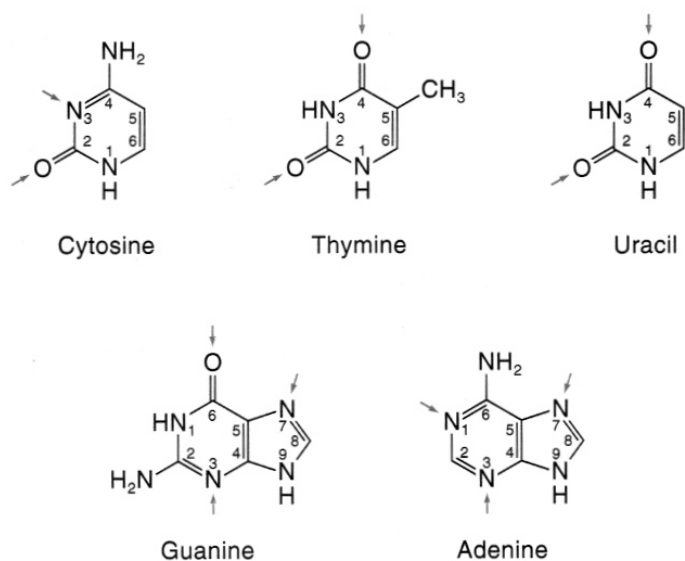
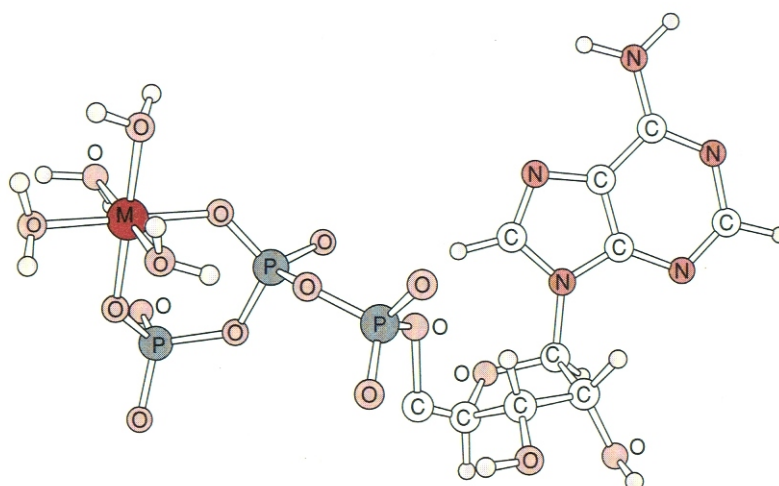


Fig. 2.13. Sítios de coordenação mais comuns nos nucleosídeos.

Estudos experimentais e teóricos tem demonstrado que o N7 nas purinas é o melhor nucleófilo e portanto, o mais provável para se ligar nos metais (Fig. 2.13). Os grupos negativos fosfatos também podem se ligar a diversos íons de metais (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Co^{3+}) através do oxigênio, como mostrado na Fig. 2.14 Enzimas que requerem ATP freqüentemente necessitam de Mg^{2+} bem como de Mg-ATP o qual serve como substrato ou cofator. Estima-se que mais de 90% do ATP na células esteja ligado ao Mg^{2+} com uma constante de associação de $3,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. O Mg^{2+} também promove a hidrólise do fosfato ligado no ATP e se liga ao ADP assim formado.



M (ATP) coordenado aos fosfatos β e γ
baseado nas estruturas cristalinas de $[\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_4(\text{triphosphate})]$

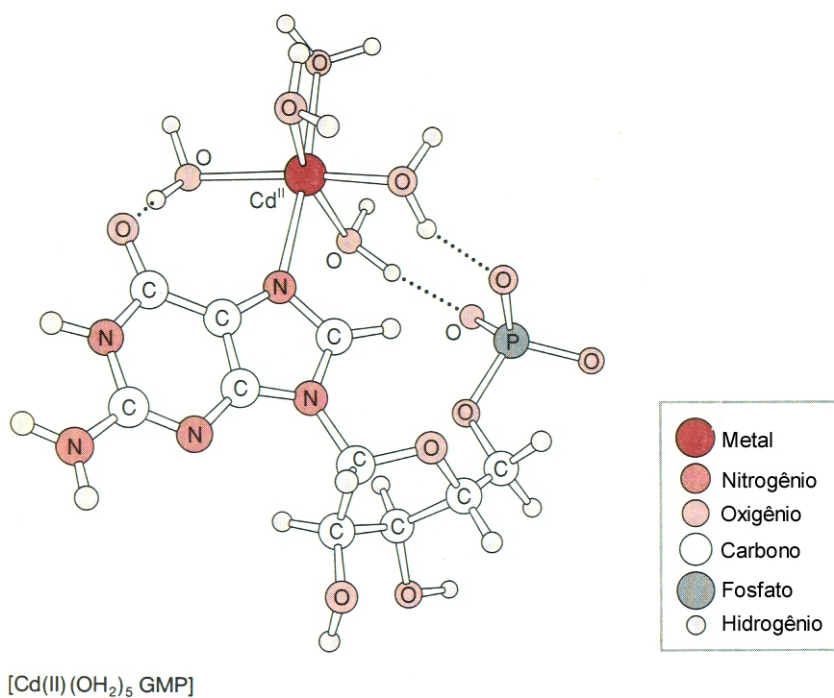


Fig. 2.14. Estrutura de dois complexos metal-nucleosídeo

2.3 Atividades de Auto-avaliação

1) Desenhe a estrutura de uma camada antiparalela β formada pelo par de hexapeptídeos $\text{NH}_2\text{-A-L-D-V-S-F-COOH}$ e $\text{NH}_2\text{-K-T-N-C-R-Y-COOH}$.

2) Aminas e amônia (NH_3) são ligantes comuns na química inorgânica. Por outro lado, o grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina raramente coordena a íons metálicos em proteínas. Proponha uma explicação para o fato desse grupo não ser um ligante comum para soluções aquosas de proteínas.

3) Represente a estrutura de uma cadeia polipeptídica (proteína) constituída pelos seguintes aminoácidos: $\text{NH}_3^+\text{-His-Tyr-Asp-Asn-COO}^-$.

4) Na seguinte seqüência de aminoácidos: His-Glu-Leu-Pro-Met-Glu Ile-Met-Thr-Arg-Ala-Pro-Glut-Asp-Ile-Asn-Ala-Gly-Glu-Asn-Glu, circule os três resíduos mais prováveis de se ligarem a um metal de transição macio.

5) As informações genéticas estão armazenadas nos polímeros dos ácidos nucléicos DNA e RNA. Os nucleotídeos estão construídos na seqüência **base-ribose-fosfato** e constituem o esqueleto do DNA e RNA. Represente as estruturas dos nucleotídeos para os seguintes pares de bases a) timina/citosina b) uracil/citosina.

6) Represente a estrutura da base citosina e assinale os sítios capazes de coordenar íons metálicos. Por que o grupo exocíclico NH_2 tem pequena capacidade de se coordenar a íons metálicos.

Capítulo 3

Transportadores de Oxigênio

Objetivos

- Identificar as estruturas e as propriedades físico-químicas das metaloproteínas transportadoras de oxigênio
- Reconhecer a importância dessas metaloproteínas para os sistemas vivos

3.1 Hemoglobina (Hb) e Mioglobina (Mb)

Mioglobina e hemoglobina estão entre as proteínas as quais foram estruturalmente caracterizadas (Fig. 3.1) e ambas contêm o grupo protoporfirina IX (heme) como centro prostético essencial.

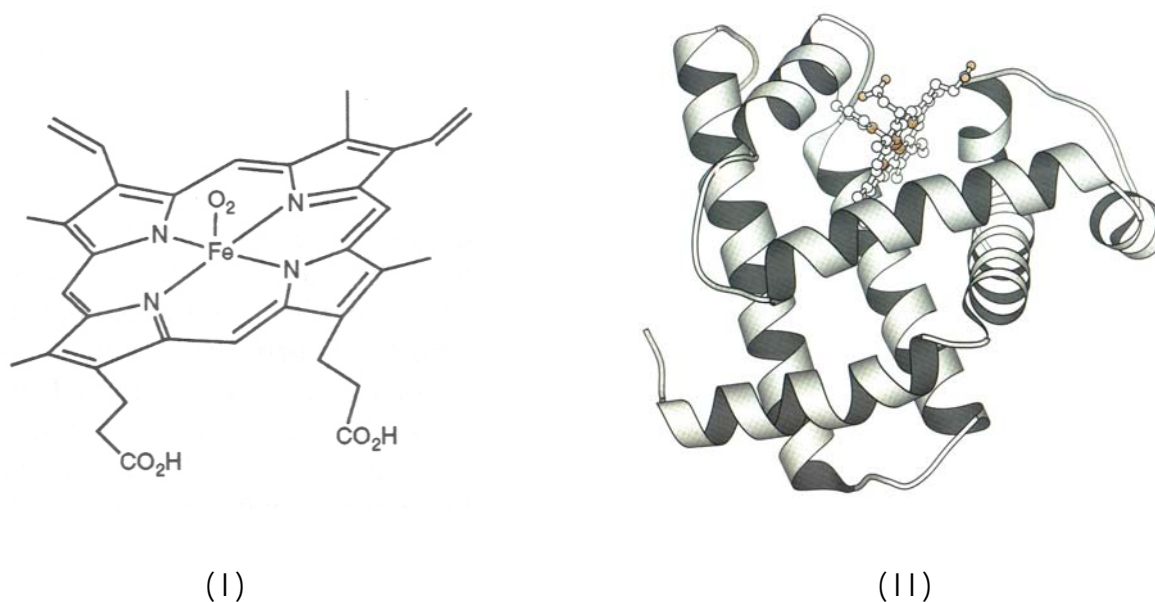


Fig. 3.1. (I) Protoporfirina IX; (II) Estrutura da mioglobina.

A função de cada uma das proteínas depende da reversibilidade em relação a ligação com o O₂, no entanto, as suas funções biológicas são diferentes. Mb armazena O₂ no tecido celular enquanto que a Hb transporta O₂ no plasma sanguíneo. Mb e Hb podem ligar uma e quatro moléculas de O₂, respectivamente, em concordância com o número de ligantes heme. Ambas, Mb e Hb ligam O₂ no

estado reduzido (Fe^{II}) e os termos *oxi-* e *deoxi-Mb* e *Hb* se referem a proteína no estado oxidado e reduzido, com e sem oxigênio, respectivamente, conforme pode ser visualizado na Fig. 3.2. O termo *met* é utilizado para descrever a forma oxidada sem a presença de oxigênio.

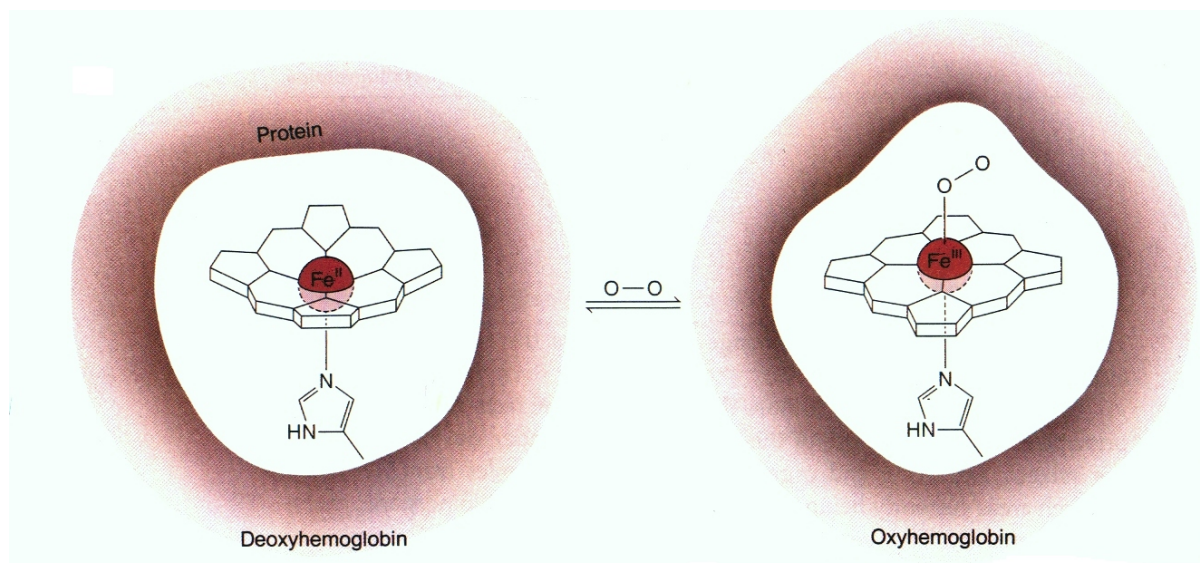


Fig. 3.2. Unidade Funcional na hemoglobina.

A Tabela 3.1 resume alguns dados termodinâmicos para a redução de O_2 e centros heme os quais são pertinentes para se discutir a funcionalidade de ligação do O_2 . Percebe-se claramente, que o O_2 é um forte oxidante em pH 7 ($E^{\circ'} = +0,82 \text{ V}$) e dessa forma deveria reagir completamente com a forma reduzida da proteína.

Tab. 3.1. Dados termodinâmicos para a redução do O_2 e do grupo Heme

Reação	$E^{\circ'} \text{ (V vs. NHE)}$
$4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+0,82
$2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+0,27
$\text{H}^+ + \text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{HO}_2$	-0,45
$\text{Hb} \cdot (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Hb} \cdot (\text{Fe}^{2+})$	+0,17

A estrutura da Mb obtida a partir do esperma de baleia, foi determinada para as três formas (deoxi, oxi e met). A forma deoxi-Hb possui um centro de Fe^{II} pentacoordenado no qual o centro

metálico se encontra 0,42 Å fora do plano constituído pelos quatro átomos de nitrogênio do anel pirrol. Ele está deslocado na direção da ligação do grupamento imidazol. Quando o oxigênio se liga, o átomo de ferro se move na direção do plano FeN₄. Na oxo-Mb a molécula de O₂ se encontra ligada ao átomo de ferro na forma *end-on*, formando uma estrutura torcida (bent) com um ângulo de 115° para as ligações Fe-O-O.

A Hb transporta o O₂ no sangue absorvendo dioxigênio do ar nos pulmões e liberando o mesmo para a Mb nos tecidos. A Hb é uma proteína contendo multisubunidades, sendo duas cadeias α e duas cadeias β de polipeptídeos. Em cada cadeia, existe um grupo Fe-protoporfirina IX o qual se encontra preso por um resíduo imidazólico de uma histidina próximo, da mesma forma que na Mb. Na forma deóxi-Hb, o átomo de Fe se encontra 0,36-0,40 Å fora do plano do anel porfirínico porém se move $\pm 0,12$ Å após ligar-se ao oxigênio.

Tanto na Hb quanto na Mb existe uma histidina situada relativamente próxima da molécula de O₂ ligada, a qual forma uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio coordenado e o próton do grupo N-H distal do resíduo His conforme foi demonstrado através de estudos de difração de nêutrons. Esta unidade Fe-O-O-H-N é acomodada de forma conveniente, resultando numa estrutura deformada (bent) da molécula de oxigênio. Por outro lado, a estrutura de raios-X para o aduto contendo a molécula de CO, revela uma estrutura distorcida em que o ângulo Fe-C \equiv O está inclinado para longe do eixo da ligação N-Fe evitando colisões estéricas com a histidina distal. Dessa forma, a natureza, de forma sábia criou o centro Fe-porfirina na Hb e Mb para ligar-se facilmente ao O₂ ao invés da molécula tóxica de CO a qual na maioria das vezes se liga muito mais fortemente que o O₂ em complexos metálicos. As proteínas Hb e Mb foram amplamente investigadas quanto às suas propriedades espectroscópicas, termodinâmicas e cinéticas. Os seus espectros eletrônicos são dominados por intensas bandas na região de 400-600 nm, as quais são oriundas de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do sistema porfirina e são conhecidas como bandas Soret α e β , e são sensíveis a oxigenação. A partir de estudos espectroscópicos de Raman ressonância, da molécula contendo O₂ coordenado e o seu análogo ¹⁸O-substituído, pôde-se identificar uma banda de estiramento O-O em ~ 1105 cm⁻¹. Esse valor é característico para o íon superóxido (O₂⁻) coordenado (ver Tab. 3.2), o que sugere que os adutos MbO₂ e HbO₂ podem ser identificados como complexos de Fe^{III} contendo esse ligante. Acoplamento magnético entre esses íons conduz a um estado fundamental diamagnético do tipo $S = 0$. Dessa forma, a coordenação do O₂ a deóxi Hb ou Mb deve ser acompanhada de um processo de transferência de elétron para formar o íon superóxido, o qual é estabilizado pela ligação de hidrogênio ao próton do imidazol distal.

Tab. 3.2. Propriedades vibracionais e geométricas das espécies dioxigênio.

Espécie	$\nu_{(O-O)}$ (cm ⁻¹)	$d_{(O-O)}$ (Å)
O ₂ ⁺	1,905	1,12
O ₂	1,580	1,21
O ₂ ⁻	1,097	1,33
O ₂ ²⁻	802	1,49

De grande importância para as funções fisiológicas da Hb e Mb, é sem dúvida, o sistema bioinorgânico sofisticado arquitetado pela natureza, no qual a molécula de O₂ se liga a Hb nos pulmões e é transferido para a Mb nos tecidos ou transferido para a Hb fetal no útero de grávidas. Fundamental nesse processo, é o fato do átomo de Fe ter a liberdade de se mover para dentro e para fora no plano do anel da porfirina, o que lhe confere a capacidade de funcionar como se fosse um gatilho para a ligação cooperativa do O₂ pelas multisubunidades da Hb. Presume-se que a proteína tenha duas estruturas quaternárias distintas designadas por R para a forma relaxada e T para a forma tensa. A primeira tem alta afinidade pela molécula de O₂, como se fossem subunidades isoladas, enquanto que a forma tensa tem a sua afinidade diminuída para se ligar com O₂. Esses dois estados conformacionais estão em equilíbrio. Na forma T, prevalente quando as quatro subunidades estão não-ligadas, sugere-se que as interações entre as subunidades bloqueiam o movimento das histidinas próximas, para dentro do plano do anel da porfirina e assim diminuindo a constante de ligação do O₂. Após a ligação de duas moléculas de O₂ na Hb, a estrutura quaternária se torna relaxada (forma R) e assim facilita a ligação das duas moléculas de O₂ remanescentes. A questão chave nesse mecanismo, é a exigência de que após a ligação do O₂, o átomo de ferro precisa se mover para dentro do plano do anel da porfirina, levando consigo a histidina a qual está ligada ao O₂ através de uma ligação de hidrogênio. Os estados de spin para algumas ferro porfirinas são apresentados na Fig. 3.3. Na forma deóxi-Hb, o ferro(II) é spin alto ($S = 2$) e possui um raio covalente muito grande para se ajustar no plano dos quatro átomos de nitrogênio. A adição de O₂ para formar Fe^{III}-O₂⁻ diminui o raio covalente do ferro, o qual então se move para dentro do plano do anel porfirina. O resultado final é um ajuste fantástico na coordenação do metal, completamente arquitetado pela natureza, o qual fornece um sistema flexível para a ligação e liberação do O₂ sob condições biológicas das mais variadas. Valores de pH baixos também favorecem a liberação de O₂ a partir da Hb, facilitando a sua transferência do sangue para outros tecidos.

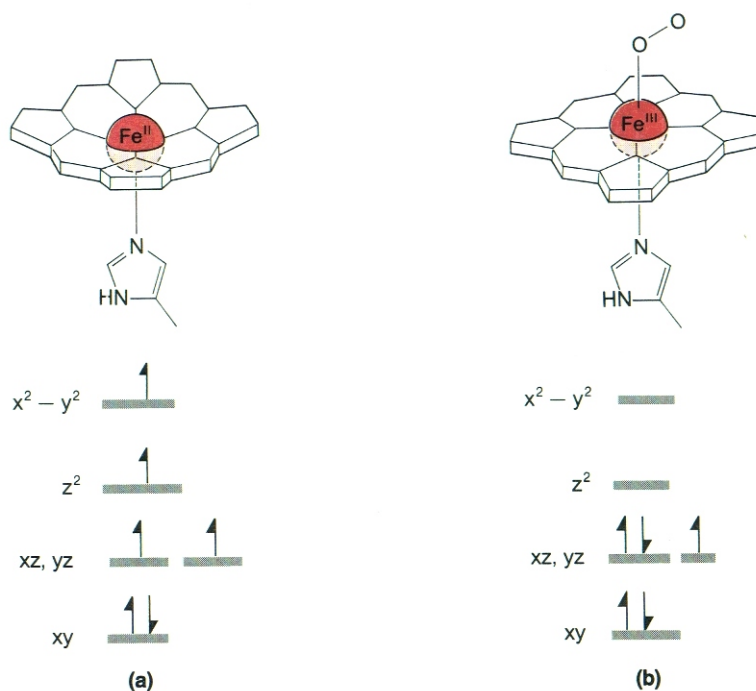
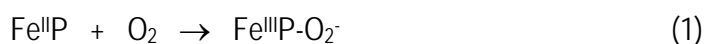


Fig. 3.3. Diagrama ilustrando as mudanças estruturais e de estado de spin que ocorrem pela ligação do O_2 na Fe-porfirina. (a) Spin-alto Fe^{II} e (b) Spin-baixo Fe^{III} .

É relativamente simples a síntese de compostos modelos de $Fe(II)$ -porfirina que apresentem propriedades físicas e estruturais similares às aquelas mostradas pelas formas deóxi Mb e deóxi Hb, como por exemplo, $[Fe(TPP)(N-Melm)]$, onde TPP = meso-tetrafenilporfirina e N-Melm = N-metilimidazol. A fixação reversível de oxigênio nesses complexos modelos representou um grande desafio para os pesquisadores. A adição de O_2 a soluções de complexos $Fe(II)$ -porfirinas resulta na formação imediata de espécies termodinamicamente estáveis do tipo $(\mu\text{-oxo})\text{diferro}(III)$. Estudos cinéticos sugerem o mecanismo mostrado nas equações 1-4, com etapas individuais as quais foram subsequentemente confirmadas através de várias técnicas espectroscópicas e estudos estruturais.



Nessas equações, P representa o anel porfirina e os numerais romanos indicam o estado de oxidação do ferro.

A oxigenação reversível de Fe(II)-porfirinas como modelos tem sido acompanhada através de diversas aproximações. Experimentos com o uso de temperaturas baixas em soluções diluídas não-aquosas tem sido muito bem sucedidos. Essa tática cinética evita as reações termodinamicamente favoráveis 1 e 4. No entanto, acima de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ os sistemas se oxidam de forma irreversível. Uma vez que essa reação de decomposição envolve a participação de duas moléculas de Fe-porfirina em etapas bimoleculares (veja equações 2 e 4), as quais não ocorrem na Hb e Mb devido às cadeias proteicas, foram planejadas táticas para bloquear essas reações em complexos modelos. Em uma dessas reações, uma Fe-porfirina impregnada num filme de poliestireno reagiu com O_2 para produzir um espectro eletrônico do tipo oxi-Hb; esse aduto pode ser deoxigenado passando-se gás nitrogênio através do filme. A estratégia de se utilizar fatores estéricos para evitar a aproximação de duas unidade Fe-P foi utilizada posteriormente na síntese de ligantes estericamente obstruídos para proteger o sítio da ligação O_2 - e assim estabilizar o complexo de O_2 desejado, em solução, sob condições de temperatura ambiente. A Fig. 3.4 mostra a estrutura de duas porfirinas, sendo uma delas denominada de *picket-fence* "cerca de estacas" devido aos quatro grupos substituintes pivalamido nas posições orto-fenila da TPP, direcionados para o mesmo lado do anel (lembra as estacas de uma cerca).

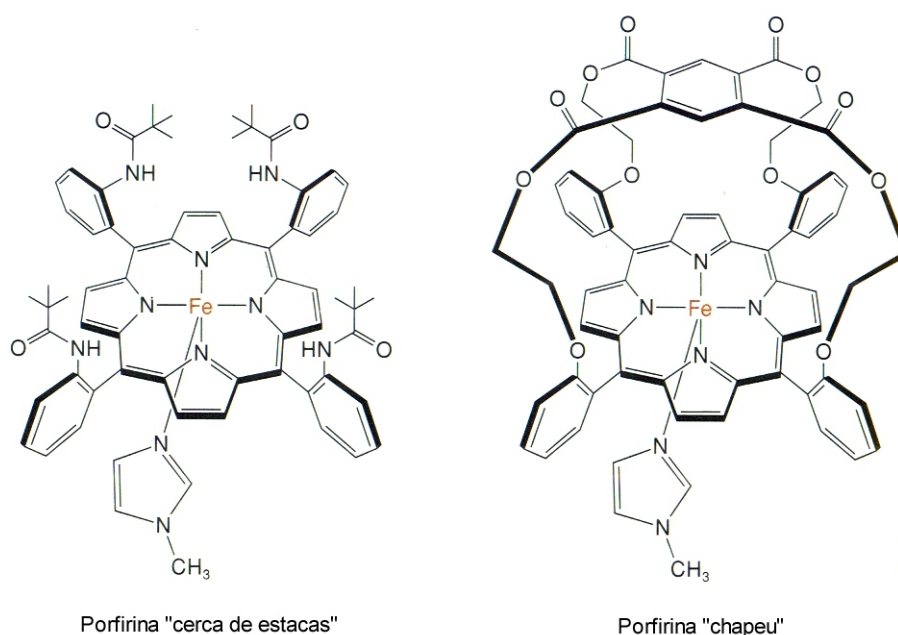


Fig. 3.4. Estrutura de dois modelos de globinas capazes de ligar O_2 de forma reversível.

Na presença da base 1-metil-imidazol a qual serve como ligante na posição axial do outro lado do anel, o complexo Fe(II)-porfirina liga O_2 de forma reversível. A porfirina modificada para a forma

porfirina-chapéu ou "*capped pophyrin*", também mostrada na Fig. 3.4, de forma similar, também liga O_2 se um grande excesso de base axial estiver presente. Nesses complexos, os substituintes dos anéis fenila se comportam como bloqueadores estéricos para a formação da unidade (μ -oxo)diferro(III) e ao mesmo tempo formam um buraco no qual a molécula de O_2 pode residir de forma adequada.

3.2 Hemeretrina (Hr)

Dentre todas as metaloenzimas de Ferro, a Hemeretrina (Hr) é uma das mais bem caracterizadas. Se diferencia da Hemoglobina (Hb) e Mioglobina (Mb) por não apresentar grupos heme. É um transportador de oxigênio em algumas classes de invertebrados marinhos como o *Spinculids*. Investigações espectroscópicas da Hemeretrina isolada da *Golfingia gouldii*, indicam que esta proteína consiste de oito subunidades idênticas. Cada subunidade contém 113 aminoácidos e dois átomos de ferro, sendo que a cada par de átomos de ferro liga-se reversivelmente uma molécula de oxigênio. Contudo, sua afinidade pelo oxigênio é levemente menor quando comparada à Hemoglobina, e não é encontrada cooperatividade na reação de oxigenação. A estrutura primária da Hr é vista na Fig. 3.5. A Hemeretrina apresenta em seu sítio ativo dois átomos de Ferro, unidos por pontes do tipo μ -(hidroxo)- μ -(carboxilato)₂ na forma $Fe^{II}Fe^{II}$ (forma deoxi-Hemeretrina), e por pontes μ -(oxo)- μ -(carboxilato)₂ na forma $Fe^{III}Fe^{III}$ (forma met-Hemeretrina). A forma deoxi-Hr (incolor) torna-se rosa-escuro após a oxigenação, resultando na forma oxi-Hr ou "pink blood". Quando da ligação do oxigênio ao centro binuclear de ferro, estes são oxidados de ferroso a férrico com a concomitante redução do oxigênio a peróxido. A auto-oxidação para a forma met-Hr ($Fe^{III}Fe^{III}$) resulta em perda da habilidade do centro de ferro em ligar-se ao oxigênio molecular, bem como aumenta sua afinidade por ânions pequenos, como azida, cianeto e hidróxido. Enquanto a Hr é mais frequentemente encontrada como um octâmero, formas monoméricas (a miohemeretrina contém uma única subunidade de 13kDa), diméricas, trímeras e tetraméricas também são conhecidas.

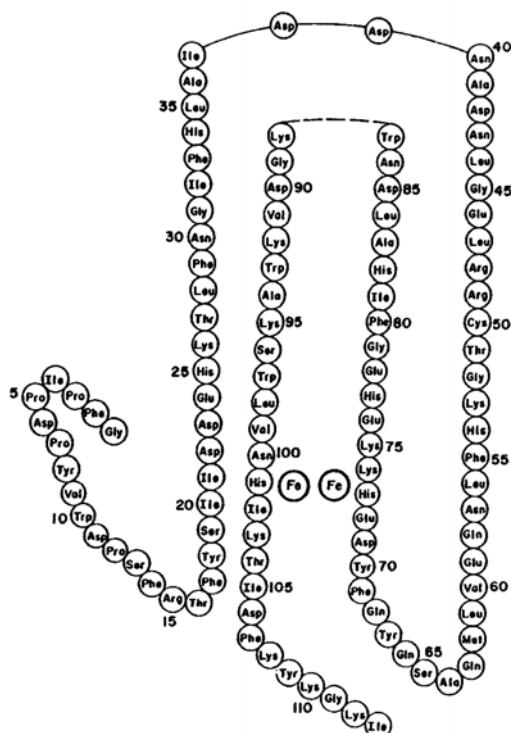


Fig. 3.5. Estrutura primária para a Hemeretrina, obtida de eritrócitos da *G. gouldii*.

A estrutura cristalina da Hr obtida com resolução de 2.0 Å indica que cada subunidade contém dois átomos de ferro os quais estão localizados no interior de quatro segmentos de α -hélice aproximadamente paralelos. (Fig. 3.6). A parte superior de duas das hélices fornece três histidinas ao centro de ferro localizado na parte superior, e um carboxilato ligado como ponte, enquanto que as outras duas hélices localizadas na parte inferior fornecem duas histidinas e outro carboxilato ao outro centro de ferro. O terceiro ligante ponte tem sido atribuído a um grupo oxo derivado do solvente. O sexto ligante é uma azida na forma azidomethemeretrina (Fig. 3.7), peróxido na forma oxihemeretrina e é ausente na forma methemeretrina.

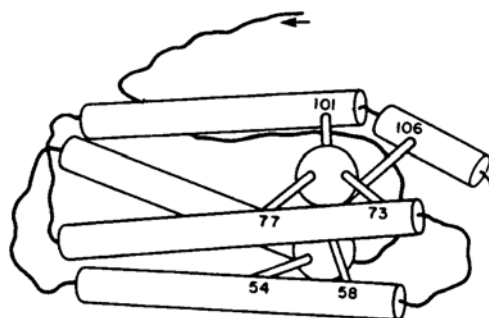


Fig. 3.6. Estrutura de subunidade da forma Met-Hr isolada do *Themiste dyscritum*, baseada no mapa de densidade eletrônica, obtido com resolução de 2.0 Å . Os números se referem aos resíduos de aminoácidos identificados como ligados ao ferro.

Análises de Raios-X para as formas metazidohemeretrina (met-N₃Hr) e oxihemeretrina (oxi-Hr), indicam um sítio ativo composto de dois átomos de ferro a 3,25 Å entre si, unidos por ponte oxo e dois grupos carboxilatos, provenientes da cadeia peptídica. A estrutura encontrada para a met-Hr-Azida é similar a da oxi-Hr, onde o íon peróxido protonado foi substituído pelo íon azida.

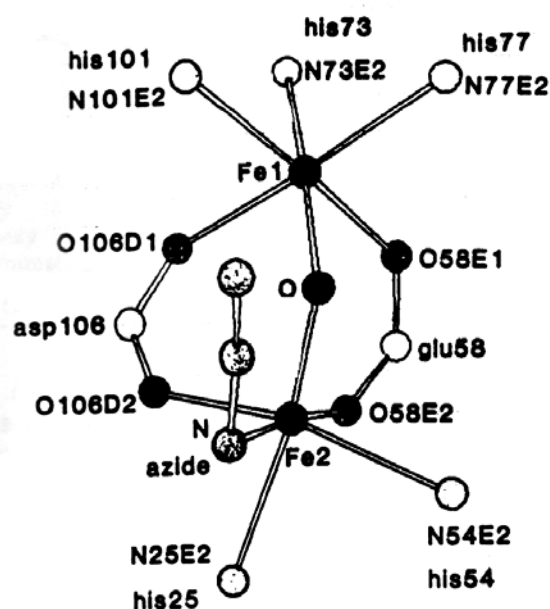


Fig. 3.7. Estrutura da forma azidomethemeretrina.

Tab. 3.3. Principais distâncias de ligação e ângulos para as formas Methemeretrina e MetHemeretrina-Azida.

Ligação/ângulo	Forma met-Hr	Forma met-Hr-Azida
Fe...Fé	3,21 Å	3,25 Å
Fe-O oxo	1,68 e 1,92 Å	1,64 e 1,89 Å
Fe-O Aspartato	2,03 e 2,10 Å	2,16 e 2,20 Å
Fe-O Glutamato	2,04 e 2,28 Å	2,33 e 2,24 Å
Fe-N Histidina	2,15 e 2,19 Å (Fe penta-coordenado) 2,17; 2,24 e 2,31 Å (Fe hexacoordenado)	2,22 3 2,25 Å (Fe pentacoordenado) 2,27; 2,29 e 2,13 Å (Fe hexacoordenado)
Fe-N Azida	-----	2,34 Å
Fe-O oxo- Fe	127 °	135 °
Fe-N1 Azida- N2 Azida	----	111 °

Embora a estrutura da forma oxi-Hr ainda não tenha sido obtida com alta resolução, a mesma parece ser estruturalmente similar à forma met-Hr. O estado de oxidação do oxigênio ligado tem sido identificado como peróxido (O_2^{2-}) (configuração *end-on*), através de estudos de Raman ressonante. A forma deoxi-Hr contém dois átomos de ferro (II), sendo cada um deles oxidado a ferro (III) após a ligação do oxigênio, o qual é reduzido a peróxido, resultando na forma oxi-Hr.

Medidas de Susceptibilidade Magnética para as formas oxi-Hr e met-Hr confirmam a presença de dois centros de ferro antiferromagneticamente acoplados. As constantes de acoplamento J para os íons de ferro (III) ($S= 5/2$), empregando-se o Hamiltoniano $H= -2JS_1S_2$, encontram-se na faixa de -77 a -134 cm^{-1} . Para a forma deoxi-Hr, a medida da susceptibilidade obtida empregando-se o método de Evans resulta em constante de acoplamento $J= -15$ cm^{-1} . Estudos de 1H NMR para a forma semimet-Hr-Azida indicam dois picos atribuídos a prótons histidínicos, a 72 e 54 ppm, atribuídos a histidinas coordenadas ao centro de Fe(III) e Fe(II), respectivamente. Estes dados sugerem que, na escala de tempo do NMR, este sistema está eletronicamente localizado. A dependência do deslocamento paramagnético isotrópico com a temperatura resultou numa constante de acoplamento $J= -20$ cm^{-1} , para a forma semimet-Hr-Azida.

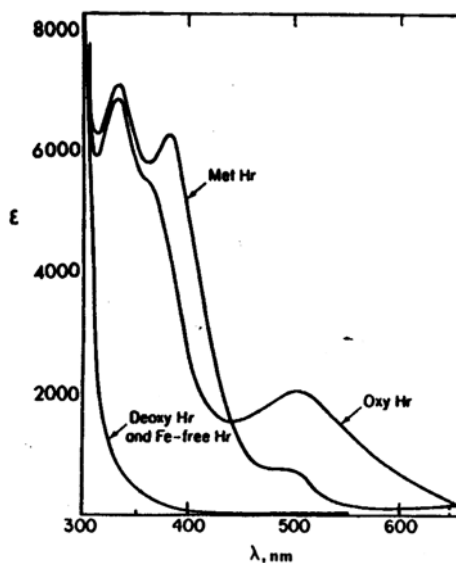


Fig. 3.8. Espectro eletrônico para a Hemeretrina nas formas deoxi, oxi e met.

Para as formas oxi-Hr, met-Hr-Azida e met-Hr-NCS são observadas bandas a 500, 446 e 452 nm, respectivamente, atribuídas a transferência de carga ligante (O_2^{2-} , N_3^- , NCS^-) para o metal, como resultado de suas intensidades. Na Fig. 3.8 é apresentado o espectro eletrônico para as formas deoxi, oxi e met-Hr. A forma oxi exibe uma banda a 500 nm a qual é inexistente na forma deoxi. Quando o comprimento de onda do laser é próximo ao desta absorção eletrônica, duas bandas aumentam de ressonância a 844 e 500 cm^{-1} , as quais são deslocadas para 798 e 478 cm^{-1} , respectivamente, pela substituição de $^{16}O_2$ por $^{18}O_2$. Estas duas bandas são atribuídas a $\nu(O_2)$ e $\nu(Fe-O_2)$ na forma oxi-Hr, respectivamente. Aparentemente, a transição eletrônica a 500 nm é devido a transferência de carga $O_2^{2-} \rightarrow Fe(III)$. A presença de $\nu(O_2)$ a 844 cm^{-1} sugere que o oxigênio está ligado como peróxido, não como superóxido.

Estudos de espectroscopia na região do infravermelho-próximo revelam a presença de transições de campo ligante para os centros de Fe(III), com bandas a 990 para a forma oxihemeretrina, a 970 e 1050 para a forma met-Hr- N_3 , e a 935 e 1040 nm para a forma met-Hr. Estas bandas são atribuídas a transições ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1(4G)$, associadas a centros de Fe(III), alto-spin, em simetria octaédrica. A presença de duas bandas no espectro da forma met-Hr é atribuído a inequivalência de coordenação para os dois centros de Fe(III), onde um está coordenado a duas e o outro a três histidinas, respectivamente. O espectro para a forma deoxi-Hr é característico de centros de ferro em simetria octaédrica, com bandas a 855 e 1100 nm, associadas a transição de campo ligante ${}^5T_2 \rightarrow {}^5E$, para um sistema Fe(II), alto-spin. O espectro eletrônico para a forma semimet-Hr é similar ao obtido para a

forma met, entretanto menos resolvido. A banda de transferência de carga $N_3^- \rightarrow$ metal, presente na forma met-Hr-Azida a 446 nm é retida na forma semimet-Hr-Azida, indicando que o ligante liga-se ao centro de Fe(III). Bandas de intervalência tem sido observadas para as formas semimet-Hr na região do infravermelho-próximo (910 e 1190 nm).

Experimentos de Raman ressonante permitem a atribuição das transições eletrônicas para as várias formas da Hemeretrina. Todas as formas oxidadas exibem quatro bandas a 320-340 ($\epsilon = 6000-7000$), 360-380 ($\epsilon = 4000-6000$), 410-440 ($\epsilon = 500-950$), e a 590-750 nm ($\epsilon = 140-200$). O estiramento Fe-O-Fe aumenta de intensidade no espectro de Raman ressonante com excitação a 380 nm, indicando que a banda localizada a 360-380 nm pode ser atribuída a uma banda de transferência de carga oxo \rightarrow Fe(III). Evidências que efetivamente confirmaram a presença de uma ponte oxo entre os centros de ferro na forma oxihemeretrina foram obtidas através de espectroscopia Raman. Quando a proteína foi exposta a uma excitação na região do UV-próximo, um aumento da ressonância do pico a 486 cm^{-1} foi observada. (Fig. 3.9). A atribuição desta vibração como estiramento simétrico Fe-O-Fe foi estabelecido pelo deslocamento desta vibração para 472 cm^{-1} após a substituição da ponte oxo por ^{18}O . (Fig. 3.9b) Embora a ponte oxo na forma oxihemeretrina não troque com o solvente, lentas mudanças ocorrem quando a proteína é reduzida para a forma deoxihemeretrina e incubada em H_2^{18}O . Após reoxigenação da proteína, esta foi transferida para uma solução de H_2^{16}O , cujo espectro é apresentado na Fig. 3.9b, no qual somente o ^{18}O permanece na ponte oxo. Com o objetivo de determinar se o grupo oxo está protonado ou interagindo através de ligações de hidrogênio, a proteína foi exposta a uma solução de D_2O . O deslocamento de 4 cm^{-1} para a vibração Fe-O-Fe para região de mais alta energia indica ligações de hidrogênio para o grupo oxo ponte na forma oxihemeretrina. (Fig. 3.9c) Como mostrado na Fig. 3.9, a intensidade do pico Fe-O-Fe é aumentada pela excitação na banda de absorção a 360 nm, a qual pode ser atribuída a um processo de transferência de carga oxo \rightarrow Fe(III) da estrutura Fe-O-Fe. Os picos atribuídos ao peróxido têm a sua intensidade seletivamente aumentada com excitação próxima a 530 nm, sugerindo que a banda de absorção na região do visível seja atribuída a um processo de transferência de carga peróxido $\text{O}_2^{2-} \rightarrow$ Fe(III).

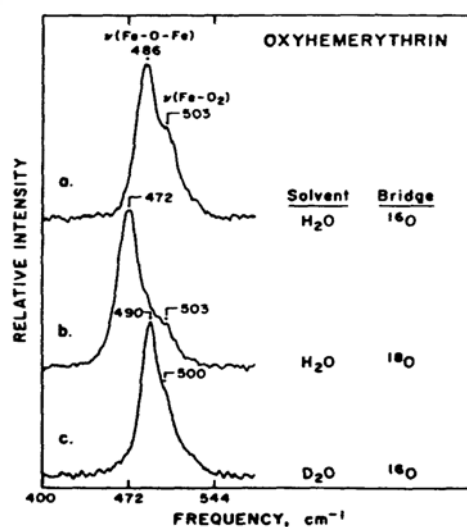


Fig. 3.9. Espectro de Raman ressonante obtido com excitação a 363,8 nm, a 0 °C, para a forma oxihemeretrina.

Comparações entre os espectros de Raman ressonante para as formas oxi-Hr e algumas met-Hr tem permitido a atribuição de propriedades espectrais típicas da presença de ligação de hidrogênio para a ponte oxo, tais como: localização da vibração Fe-O-Fe próximo a 490 cm⁻¹, e deslocamento desta frequência vibracional em água. Na maioria das formas da met-Hr a vibração Fe-O-Fe ocorre entre 507-514 cm⁻¹, região a qual não é afetada pela deuteração da proteína. Isto implica que a conformação da unidade binuclear é inalterada pela substituição por deutério dos grupos funcionais tais como amida e imidazóis. Um modelo, o qual evidencia o comportamento anômalo da forma oxi-Hr é apresentado na Fig. 3.10. Ele prediz que o íon peróxido está protonado e interage via ligações de hidrogênio com o oxigênio da ponte. Propõe-se uma estrutura análoga para a forma hidroxomethemeretrina, devendo apresentar um ligante hidróxido interagindo via ligações de hidrogênio com o oxigênio da ponte oxo, ou diretamente (requerendo para isto um anel de quatro membros).

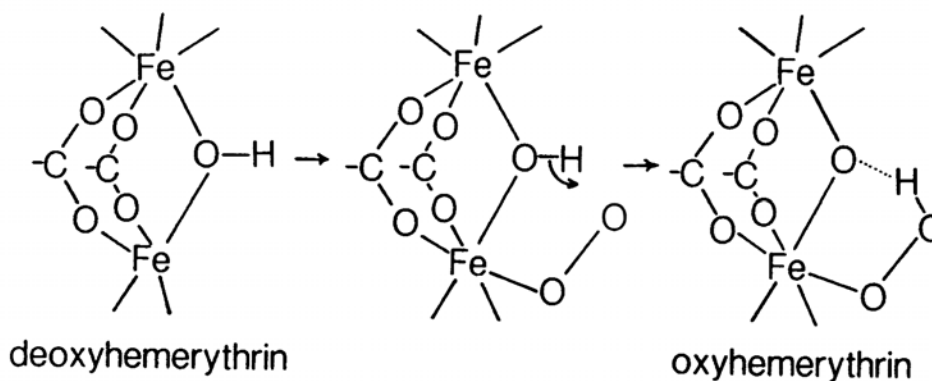


Fig. 3.10. Estruturas propostas para as formas oxi e deoxi-Hr e um possível mecanismo para a sua interconversão.

O oxigênio liga-se ao centro de ferro (II) pentacoordenado, e este é oxidado por um elétron, gerando o aduto superóxido e a forma chamada semimethemeretrina ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$), a qual ainda não foi isolada). O aduto superóxido abstrai um átomo de hidrogênio da ponte hidroxila e torna-se um hidropéroxido. Ao mesmo tempo, o centro de ferro (II) remanescente doa um elétron para o oxigênio da ponte para completar a oxidação por dois elétrons da unidade binuclear, resultando na forma $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ (oxihemeretrina).

Evidências adicionais para a ligação do oxigênio como hidropéroxido na forma oxi-Hr provém da análise dos modos vibracionais associados ao peróxido: o estiramento O-O a 844 cm^{-1} e o estiramento Fe-O-Fe a 503 cm^{-1} . Estes componentes espectrais podem ser separados da vibração Fe-O-Fe pela escolha apropriada de comprimentos de onda de excitação (Fig. 3.11).

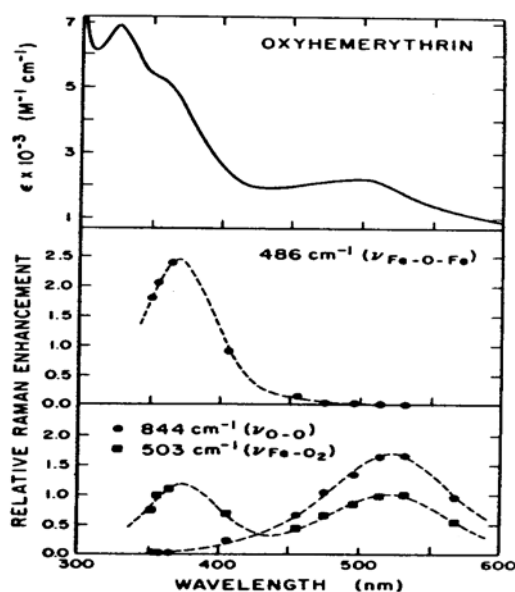


Fig. 3.11. Espectro de absorção para a oxi-Hr. Intensidades Raman para os picos a 486, 503 e 844 cm^{-1} , medidos relativos ao pico do sulfato (981 cm^{-1} , utilizado como padrão interno).

As formas semimet-Hr são intermediários termodinamicamente instáveis na oxidação da forma deoxi ou redução da forma met. A estabilidade cinética da forma semimet-Hr é devido à mudanças conformacionais que devem ocorrer entre as formas deoxi e met. As duas formas de semimet-Hr ocorrem dependendo se a forma deoxi-Hr é oxidada para gerar a forma semimet-Hr O ou se provém da redução da forma met-Hr, gerando a forma semimet-Hr R. Os espectros de RPE (Fig. 3.12) para ambas as formas são levemente diferentes, com valores de g de 1,96; 1,88; 1,67 para a forma semimet-Hr R e 1,95; 1,85 e 1,57 para a forma semimet-Hr O, sugerindo interação antiferromagnética entre os centros de FeIII e FeII, entretanto este acoplamento é fraco, pois o sinal desaparece a temperatura acima de 30 K. À ambas as formas ligam-se ânions pequenos, como azida, resultando em compostos mais estáveis, os quais parecem possuir estruturas similares, independentemente de preparados com a forma O ou R da semimet-Hr, obtendo-se valores de $g = 1,94$; 1,85 e 1,57. Os sinais de RPE para as formas semimethemeretrina são muito similares aqueles observados para proteínas de metais mistos [2Fe-2S], as quais contém um íon férrico e um ferroso. Um modelo teórico para a análise dos valores de g indica que há uma diferença muito pequena na distorção rômbrica dos centros de FeII, o que se traduz em espectros levemente diferentes para as formas O ou R da semimet-Hr.

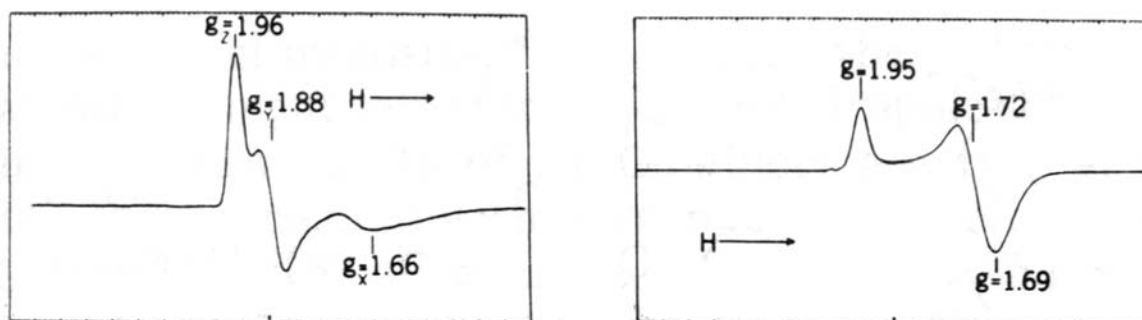


Fig. 3.12. Espectros de RPE para as formas semimet-Hr R (esquerda) e semimet-Hr O (direita), obtidos a temperatura de hélio, extraídas da *Themiste zostericola*.

Resultados de espectroscopia Mössbauer para a forma oxi-Hr, extraída da *Golfindia gouldii* sugere que os dois átomos de ferro estão em ambientes de coordenação distintos, resultando em dois dubletos. Entretanto para as formas deoxi e met-Hr os ambientes de coordenação devem ser similares, pois observa-se um único dubleto. Para a forma deoxi-Hr tem-se um único dubleto com parâmetros $\delta = 1,14$ mm/s e $\Delta E_Q = 2,76$ mm/s, a 4,2 K, indicativo de Fe(II), alto-spin, provavelmente ligados a nitrogênios e oxigênios, onde os dois centros metálicos são indistinguíveis, o que não traduz a assimetria da estrutura. Para a forma met-Hr tem-se: $\delta = 0,46$ e $\Delta E_Q = 1,57$ mm/s, a 115 K. A forma oxi-Hr origina um espectro Mössbauer com dois dubletos, com o mesmo valor de Deslocamento Isomérico para ambos: $\delta = 0,51$ mm/s, mas com diferentes Desdobramentos Quadrupolares: $\Delta E_Q = 0,91$ e $1,93$ mm/s. Este resultado indica que na forma oxi-Hr tem-se dois centros de ferro, alto-spin, antiferromagneticamente acoplados. O espectro para a forma met-Hr-Azida (Met-Hr-N₃) consiste de dois dubletos, muito similares à forma oxi-Hr: $\Delta E_Q = 1,95$ e $1,47$ mm/s e ambos com mesmo deslocamento isomérico: $\delta = 0,51$ mm/s, sugerindo centros de ferro (III), alto-spin.

3.3 Hemocianina (Hc)

A hemocianina é responsável pelo transporte de oxigênio em moluscos e artrópodes, sendo esta a metaloenzima de cobre do tipo III com mais informações estruturais disponíveis na literatura. As formas oxidada e reduzida da hemocianina tiveram suas estruturas resolvidas por difratometria de raios X (Fig. 3.13). Na forma reduzida, o sítio ativo apresenta dois centros de Cu(I) separados por uma distância de 3.8 ± 0.4 Å, sendo que nenhum elemento ponte entre os dois centros metálicos foi

localizado. A cada centro estão coordenados três átomos de nitrogênio doadores imidazólicos correspondentes a resíduos do aminoácido histidina, estando um deles envolvido numa ligação covalente com um resíduo cisteína. A reação da hemocianina reduzida com oxigênio resulta numa unidade binuclear de Cu(II) pentacoordenados separados por uma distância de 3,5 Å e ligados entre si por uma unidade ponte peróxido, a forma oxo-hemocianina (Fig. 3.13).

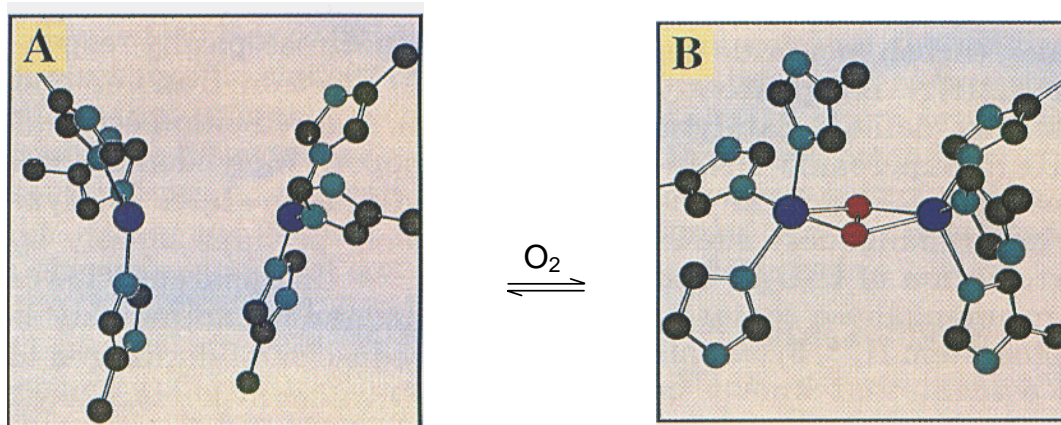


Fig. 3.13. Estrutura cristalina do sítio ativo da deoxi-hemocianina (A) e oxo-hemocianina (B).

A atribuição do estado de oxidação do oxigênio está baseado em compostos modelo, principalmente no complexo $[\text{Cu}_2[\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{C}_3\text{HN}_2)_3]_2(\text{O}_2)]$, ($\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{C}_3\text{HN}_2)$ = hidridotris(3,5-diisopropil-1-pirazolil)borato) apresentado por Kitajima e colaboradores, (Fig. 3.14) e em estudos espectroscópicos da metaloenzima propriamente dita. As técnicas de espectroscopia eletrônica, RPE, Raman ressonante e magnetoquímica comprovam que os dois centros metálicos contém um íon peróxido coordenado em ponte na forma $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta$.

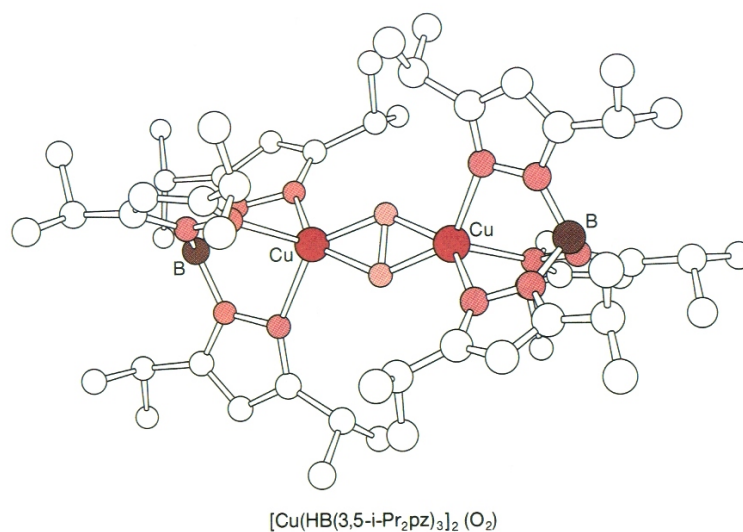


Fig. 3.14. Estrutura de um modelo para a oxo-hemocianina; $[\text{Cu}_2[\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{C}_3\text{HN}_2)_3]_2(\text{O}_2)]$.

Normalmente, compostos de Cu(II) apresentam apenas uma banda pouco intensa devido a transições d-d na faixa de 600-700 nm, porém o espectro eletrônico da forma oxo-hemocianina é dominado por bandas intensas em torno de 345 nm ($\epsilon=20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 570 nm ($\epsilon=1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) atribuídas a transições de transferência de carga do tipo ligante - metal do íon peróxido para Cu(II). O espectro Raman ressonante apresenta uma banda na região de 750 cm^{-1} atribuída ao estiramento vibracional O-O do íon peróxido coordenado. Outra característica importante da forma oxo-hemocianina é o diamagnetismo devido ao forte acoplamento antiferromagnético entre os dois íons Cu(II) ($-2J > 600 \text{ cm}^{-1}$), o que resulta em ausência no espectro de RPE.

3.4 Atividades de Auto-Avaliação

- 1) Um grande número de complexos de Co^{II} ligam a molécula de O_2 . Por exemplo, $[\text{Co}(\text{CN})_5]^{3-}$ reage com O_2 para formar o complexo binuclear $[(\text{CN})_5\text{Co}-\text{O}_2-\text{Co}(\text{CN})_5]^{6-}$. Apesar do material de partida ser paramagnético, o produto é diamagnético. Proponha uma formulação para a estrutura eletrônica (estados de oxidação) do metal e O_2 no produto. Como você testaria a sua hipótese experimentalmente?
- 2) Explique o que deverá ocorrer em relação a ligação de O_2 na Fe(II)-porfirina se utilizarmos o ligante 1,2-dimetil-imidazol ao invés de 1-metil-imidazol ligado ao ferro na posição axial da porfirina.
- 3) A deóxi-Hb é paramagnética com 4 elétrons desemparelhados. A óxi-Hb por outro lado, é diamagnética ($S = 0$). O que sugerem esses resultados em relação aos estados de oxidação do ferro nesses compostos?
- 4) A molécula de O_2 , sem dúvida, é um dos componentes mais importantes dentre todos encontrados na natureza. Assim sendo, é de suma importância se conhecer as propriedades eletrônicas da mesma. Represente um esquema de orbitais moleculares para o O_2 . Use o esquema para prever: 1) força de ligação; 2) distância de ligação e 3) frequência de estiramento no infra-vermelho para cada uma das seguintes espécies: O_2 , O_2^+ , O_2^- , O_2^{2-} .

-
- 5) Um grande número de complexos de Co^{II} ligam a molécula de O_2 . Por exemplo, $[\text{Co}(\text{CN})_5]^{3-}$ reage com O_2 para formar o complexo binuclear $[(\text{CN})_5\text{Co}-\text{O}_2-\text{Co}(\text{CN})_5]^{6-}$. Apesar do material de partida ser paramagnético, o produto é diamagnético. Proponha uma formulação para a estrutura eletrônica (estados de oxidação) do metal e O_2 no produto. Como você testaria a sua hipótese experimentalmente?
 - 6) Explique o que deverá ocorrer em relação a ligação de O_2 na Fe(II)-porfirina se utilizarmos o ligante 1,2-dimetil-imidazol ao invés de 1-metil-imidazol ligado ao ferro na posição axial da porfirina.
 - 7) Estabeleça as principais diferenças estruturais e funcionais entre a mioglobina e hemoglobina.
 - 8) A hemeretrina e a hemocianina são metaloenzimas binucleares de ferro e cobre, respectivamente. Ambas ligam oxigênio na forma de peróxido. Represente as diferenças estruturais em relação ao peróxido nas duas metaloenzimas.
 - 9) As formas óxi-Hr e met-Hr apresentam forte acoplamento antiferromagnético e são diamagnéticos entre 1,2 e 4 K. Por outro lado, as duas formas apresentam valores de J (constante de acoplamento) bastante distintos: $J = -77 \text{ cm}^{-1}$ para a óxi-Hr e $J = -134 \text{ cm}^{-1}$ para a met-Hr. a) Explique a origem dessa diferença em detalhes. b) A forma reduzida de óxi-Hr tem $J = -15 \text{ cm}^{-1}$. Compare com a forma óxi-Hr e explique a origem da diferença.
 - 10) O espectro Mössbauer para a forma oxi-Hr, extraída da *Golfindia gouldii* mostra a presença de dois dubletos. Esclareça esse resultado utilizando as informações estruturais da Oxi-Hr (Fig. 3.7).
 - 11) As formas semimet-Hr apresentam espectros de EPR rômnicos com três sinais para os tensores g compreendidos entre 1,96 e 1,6 em baixas temperaturas. Dê uma explicação para esses resultados.

Capítulo 4

Outras Proteínas de Cobre

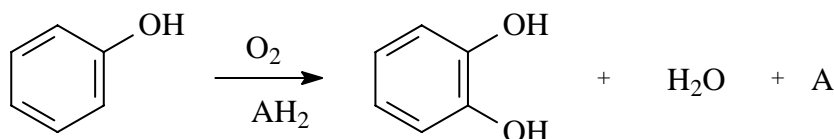
Objetivos

- Identificar as estruturas, as propriedades espectrais de metaloproteínas mono- e bi-nucleares de cobre
- Conhecer os mecanismos de atividade catalítica das metaloenzimas mono- e bi-nucleares de cobre.

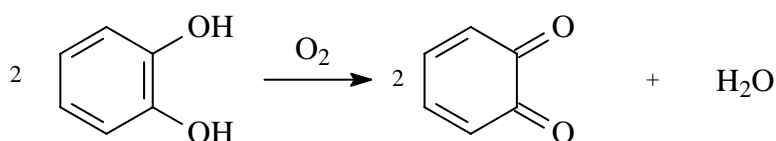
4.1 Tirosinase

A tirosinase é uma monooxigenase encontrada em microorganismos, plantas e animais que catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis e a oxidação de catecóis a *o*-quinonas conforme mostrado abaixo:

Função de **cresolase**



Função de **catecolase** ou **catecol oxidase**



Esta enzima é responsável pela conversão bioquímica de tirosina ao pigmento colorido melanina. A estrutura cristalina do sítio ativo da tirosinase ainda não foi resolvida por difratometria de raios X. Porém, comparações das propriedades químicas, RPE, absorção eletrônica, dicroísmo circular e espectroscopia Raman ressonante da tirosinase e seus derivados com aquelas da hemocianina revelam grande semelhança, o que permite sugerir que a tirosinase também contém no seu sítio ativo um composto binuclear de cobre que forma um aducto estável com o íon peróxido. Estudos de EXAFS da tirosinase *Neurospora crassa* revelam uma distância metal-metal de 3,6 Å para a espécie oxi-

tirosinase e 3,4 Å para a forma met-tirosinase, respectivamente. A forma met-tirosinase, também chamada de estado de repouso, corresponde a uma espécie binuclear de cobre(II) que não contém o íon peróxido coordenado e é caracterizada por transições fracas na região de 600-700 nm e pelo forte acoplamento antiferromagnético que leva a ausência no espectro de RPE.

Solomon e colaboradores sugerem um mecanismo para a atividade da tirosinase (Fig. 4.1). No ciclo de atividade de monooxigenase, um substrato fenólico liga-se em posição axial a um dos centros de cobre da oxi-tirosinase (Cu(II)-O₂-Cu(II)) e um rearranjo do complexo ternário Cu₂/O₂²⁻/substrato a uma geometria bipirâmide trigonal orienta para a *ortho*-hidroxilação do substrato pelo íon peróxido. A coordenação do produto difenólico seguido de uma transferência de elétrons intramolecular resulta na oxidação do catecol à *o*-quinona correspondente e na redução dos centros de cobre, restabelecendo a forma deoxi-tirosinase. O centro de dicobre(I) interage com O₂ restabelecendo a forma oxi-tirosinase e dando continuidade ao ciclo catalítico. No ciclo de atividade de catecolase, as formas oxi e met da enzima reagem com catecol, conduzindo a oxidação do mesmo à correspondente *o*-quinona.

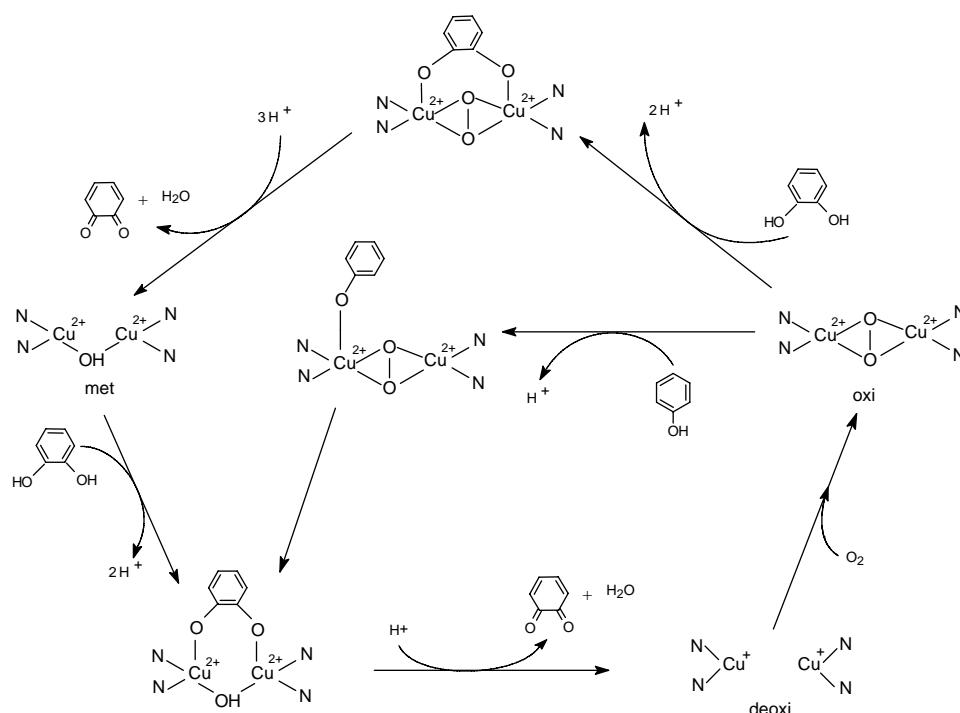


Fig. 4.1. Mecanismo proposto para a monooxigenação de fenóis e oxidação de catecóis catalisadas pela tirosinase. Os ligantes axiais dos átomos de cobre não foram incluídos para tornar o desenho mais claro.

4.2 Catecol Oxidase

A catecol oxidase é o terceiro membro do grupo das metaloenzimas de cobre do tipo III. Esta enzima catalisa a oxidação de catecóis às correspondentes *o*-quinonas, sem apresentar atividade sobre tirosinas. As quinonas resultantes são altamente reativas e se auto-polimerizam formando o pigmento escuro melanina. Recentemente, as estruturas cristalinas das formas oxidada e reduzida da catecol oxidase isolada da batata doce foram determinadas por cristalografia de raios X (Fig. 4.2). A forma oxidada consiste de dois centros de Cu(II) com geometria pirâmide trigonal, estando cada cobre coordenado por três átomos de nitrogênio de resíduos de histidinas e um grupo hidróxido fazendo ponte entre os dois centros metálicos. A distância Cu...Cu foi determinada como sendo 2,9 Å. Após a redução, a separação metal – metal na enzima aumenta para 4,4 Å, sem significantes mudanças conformacionais nos grupos ligantes além da perda da ponte hidróxido. O CuA contém agora uma molécula de água coordenada e assume uma geometria de pirâmide trigonal distorcida, enquanto o CuB assume uma geometria quadrada planar com um sítio de coordenação livre.

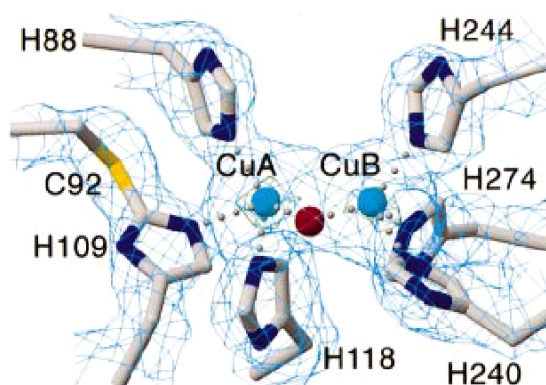


Fig. 4.2. Estrutura cristalina do sítio ativo da forma oxidada da catecol oxidase.

O mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a ação desta enzima é apresentado na Fig. 4.3. É sugerida a ligação simultânea do substrato catecol monodentado e de oxigênio na forma de íon peróxido $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ à enzima na forma reduzida, sendo que o centro de cobre que recebe o substrato em posição axial fica hexacoordenado, assumindo uma geometria octaédrica distorcida. No complexo ternário catecol oxidase/ $\text{O}_2^2\text{-}$ /substrato dois elétrons podem ser transferidos do substrato para o íon peróxido seguido pela protonação do grupo peróxido e quebra da ligação O-O, acompanhada pela oxidação do catecol (formação da *o*-quinona) e perda de água. A protonação do grupo ponte pelo

solvente leva o sítio ativo ao estado de repouso Cu(II)-OH-Cu(II) , o qual pode reagir com outra molécula de substrato reduzindo novamente a enzima ao estado Cu(I)-Cu(I) e repetindo o ciclo catalítico.

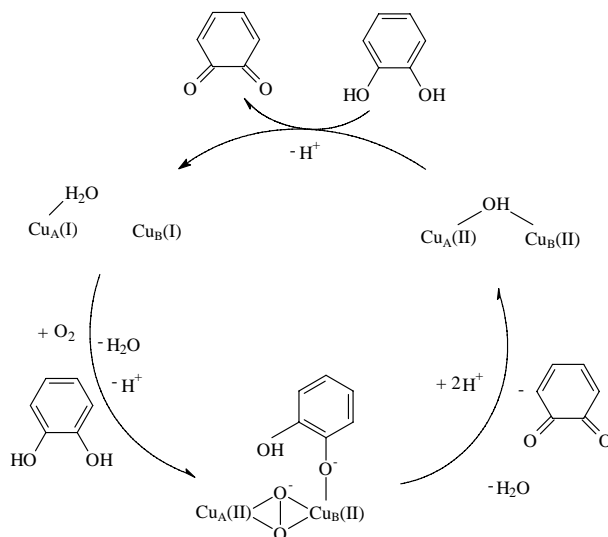


Fig. 4.3. Mecanismo proposto para a oxidação de catecóis catalisada pela catecol oxidase. Os ligantes N-doadores foram omitidos por clareza.

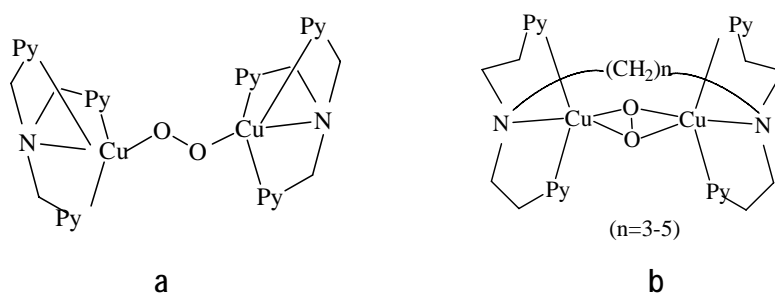
O espectro eletrônico da forma oxidada da catecol oxidase apresenta máximos na faixa de 700-800 nm atribuídos a transições d-d e uma transição fraca na faixa de 310 e 330 nm atribuída a uma transição do tipo ligante metal provavelmente do μ -hidróxido para Cu(II) . Ao coordenar o íon peróxido surgem máximos atribuídos a transições de transferência de carga do íon peróxido para Cu(II) em 343 nm ($\epsilon \approx 6500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 580 nm ($\epsilon \approx 450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Além disso, os centros binucleares de cobre na catecol oxidase são caracterizados pelo forte acoplamento antiferromagnético e ausência no espectro de RPE.

Comparações química e espectral da hemocianina, tirosinase e catecol oxidase sugerem uma grande semelhança entre os sítios ativos destas enzimas e evidencia a presença de dois centros de cobre acoplados, coordenados por três átomos de nitrogênio de histidinas cada. A maior diferença entre as três enzimas é a acessibilidade aos sítios ativos. A tirosinase e a catecol oxidase reagem com ligantes externos, incluindo moléculas de substrato, enquanto que a hemocianina não reage.

4.3 Modelos Estruturais Relevantes para Metaloenzimas de Cobre

A presença de centros binucleares de cobre nas enzimas hemocianina, tirosinase e catecol oxidase tem induzido químicos de coordenação a sintetizar e caracterizar complexos binucleares de cobre como modelos para estes sistemas naturais. Através da síntese de ligantes O, N doadores e posterior complexação destes com os íons Cu(I) e Cu(II) são obtidos complexos de cobre candidatos a modelos biomiméticos. A determinação das propriedades dos complexos e comparação com as propriedades das enzimas contribui na elucidação de aspectos estruturais ainda não totalmente esclarecidos nestes sistemas.

Um exemplo importante de como esta modelagem tem contribuído de forma efetiva é a evolução com relação à obtenção de compostos modelo para coordenação de oxigênio na forma de íon peróxido aos centros de cobre(I) nas enzimas. Karlin e colaboradores relataram os seguintes compostos:



O complexo $[\text{Cu}(\text{TMPA})_2(\text{O}_2)]^{2+}$ (a), (TMPA = tris-piridilmetilamina) cuja estrutura foi resolvida por difratometria de raios X, apresenta o íon peróxido coordenado na forma *trans*- μ -1,2 e reproduz razoavelmente as transições eletrônicas presentes nas enzimas ($\lambda=440$ nm ($\epsilon=2000$ M⁻¹ cm⁻¹), 525 nm ($\epsilon=11500$ M⁻¹ cm⁻¹), 590 nm (ombro, 7600 M⁻¹ cm⁻¹)), assim como as propriedades magnéticas (diamagnético). Porém, a distância metal-metal (Cu...Cu = 4,36 Å) é aproximadamente 1 Å maior do que a distância presente na hemocianina, descartando este modo de coordenação do íon peróxido na enzima. Já o complexo $[\text{Cu}_2(\text{N}_4\text{PY}_2)(\text{O}_2)]^{2+}$ (b) (N₄PY₂ = *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridiletíl)1,3-propanodiamina) reproduz as propriedades espectroscópicas e também a distância metal-metal (Cu...Cu = 3,37 Å), porém esta distância foi estimada por EXAFS e portanto a forma de coordenação do íon peróxido neste modelo não está totalmente esclarecida. Kitajima e colaboradores apresentaram um modelo que foi conclusivo com relação a este tema. O composto $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)_2(\text{O}_2)]$, cuja estrutura foi resolvida por difratometria de raios X, apresenta um grupamento ponte peróxido coordenado na forma μ - η^2 : η^2 (Fig 4.4) e modela todas as propriedades da forma oxidada das enzimas hemocianina e tirosinase, conforme apresentado na Tab. 4.1.

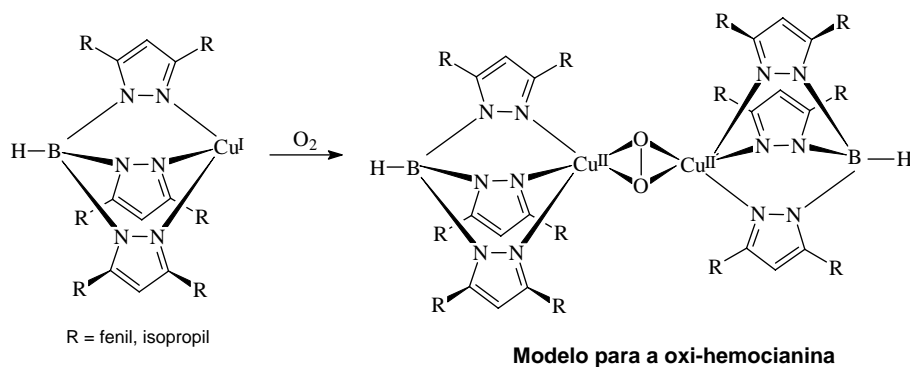


Fig 4.4. Modelo sintético para a oxi-hemocianina, tirosinase e catecol oxidase

Tab. 4.1 Comparação das propriedades da hemocianina e do composto modelo apresentado por Kitajima e colaboradores.

Oxi-hemocianina	$[(\text{Cu}_2[\text{HB}(3,5\text{-Pr}_2\text{C}_3\text{HN}_2)_3]_2)(\text{O}_2)]$
Diamagnético	Diamagnético
580 nm($1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 340nm($20000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	551 nm($790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 349nm($21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
$\nu(\text{O-O}) = 744\text{-}752 \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{O-O}) = 741 \text{ cm}^{-1}$
$\text{Cu}\dots\text{Cu} = 3,5 - 3,7 \text{ \AA}$	$\text{Cu}\dots\text{Cu} = 3,56 \text{ \AA}$

4.4 Galactose oxidase

A *galactose oxidase* (GAO) é uma metaloenzima mononuclear de cobre, secretada por alguns fungos, como o *Dactylium dendroids* e o *Polyporus circinatus*, que catalisa a oxidação de vários álcoois primários aos correspondentes aldeídos com a redução acoplada do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (eq. 1). Uma outra enzima relatada na literatura com uma atividade similar é a glioxal oxidase (GLO), que também produz H_2O_2 , conforme pode ser verificado pela equação 2. A GAO é monomérica e possui um peso molecular de 68 kDa, com 639 aminoácidos.



A função fisiológica precisa da GAO até o momento não é bem clara, porém tem sido sugerido que o H_2O_2 produzido é aparentemente usado no processo de degradação de lignina.

Detalhes estruturais, espectroscópicos e estudos cinéticos têm demonstrado que a reação de dois equivalentes redox catalisada pela GAO é realizada por um sítio ativo contendo apenas um átomo de cobre do tipo II (azul), que fornece apenas 1 equivalente redox no processo entre os estados de oxidação +1 e +2. Este aparente paradoxo (2 equivalentes redox para apenas um átomo de cobre) é resolvido pelo envolvimento de outro cofator ativo redox, cuja identificação recente o relaciona a um resíduo tirosinato coordenado ao cobre, que é oxidado a um radical tirosil (fenoxil) no processo catalítico. Em particular, dados espectroscópicos indicam que a espécie reativa chave no processo contém uma interação magnética Cu(II)-radical fenoxil, que é responsável diretamente pela oxidação dos substratos alcoólicos. Dessa forma, explica-se o processo catalisado por uma reação de dois equivalentes redox, no qual participam duas reações redox simples [Cu(II)/Cu(I) e tirosinato/radical tirosil].

A estrutura da galactose oxidase (Fig. 4.5) foi determinada via difratometria de raios-X, a partir da enzima nativa, em três formas distintas, com acetato (pH 4.5, resolução de 1.7 Å) (Fig. 4.5a), água (pH 7.0, resolução de 1.9 Å) (Fig. 4.5b) e a forma apo (sem o centro metálico, resolução de 1.9 Å) (Fig. 4.5c). Em pH 4.5 a enzima possui um sítio mononuclear de Cu(II) em um ambiente de coordenação piramidal quadrado, com dois átomos de nitrogênios histídínicos (Hist 496, Hist 581, equatoriais), dois oxigênios tirosinatos (Tir272, equatorial, Tir495, axial) e um ânion acetato exógeno (equatorial) (Fig. 4.5a). Em pH 7.0 o sítio de cobre (II) possui praticamente a mesma estrutura só ocorrendo a troca do ânion acetato por uma molécula de água (Fig. 4.5b).

As distâncias entre as ligações O_{axial} -Cu(II) são relativamente longas (2,7 e 2,6 Å, respectivamente, para as formas acetato e aquo), comparativamente às ligações $O_{equatorial}$ -Cu(II) (1.9 Å em ambos os casos). Um esquema mais detalhado do sítio ativo da GAO é apresentado na Fig. 4.6. Todas as estruturas revelam uma modificação biológica no resíduo Tir272, que é covalentemente ligado, por uma ponte tio-éter a um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína.

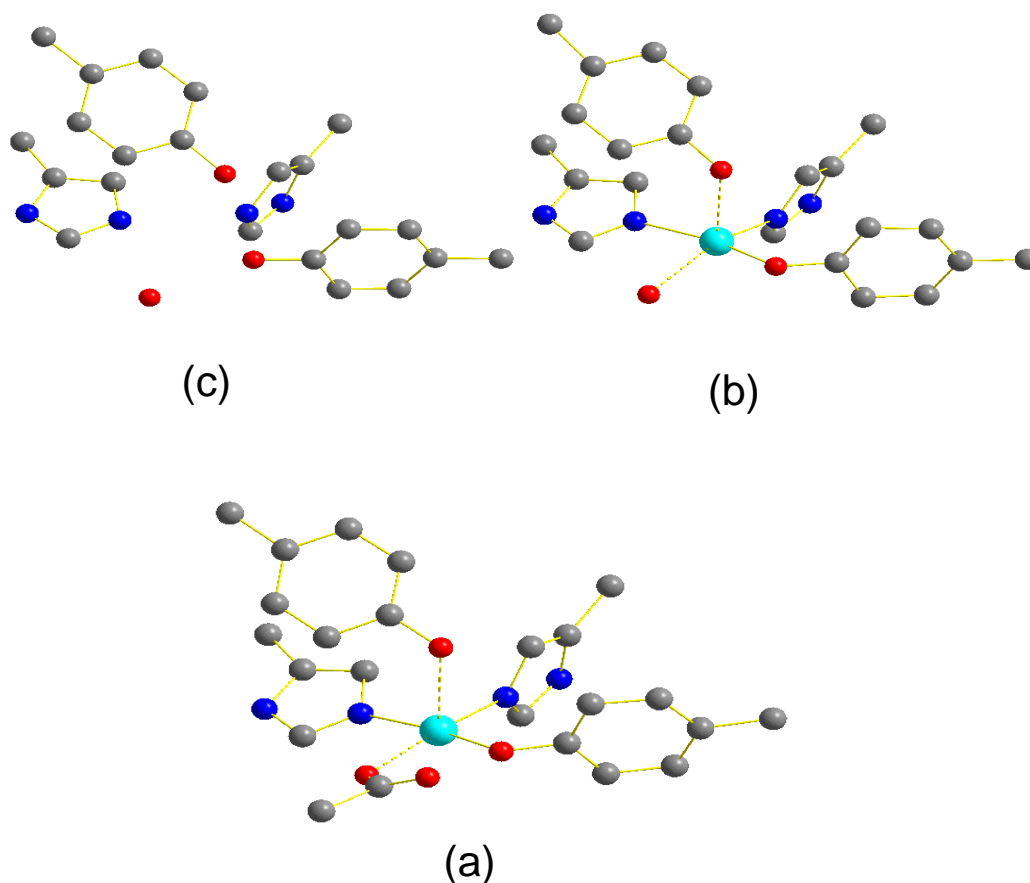
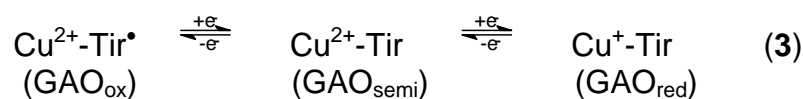


Fig. 4.5. Estruturas moleculares da GAO determinadas via difratometria de raios X: (a) forma em pH 4.5 (acetato), (b) forma em pH 7.0 (água) e (c) apoenzima. Em verde (átomos de cobre), em azul (átomos de N) e em vermelho (átomos de O).

Sabendo-se que o par tirosinato/radical tirosil em conjunto com o par redox Cu(II)/Cu(I), fornece a capacidade de dois equivalentes redox requerida no mecanismo funcional da GAO, três estados de oxidação podem ser definidos para a enzima (eq. 3), os quais tem sido identificados por estudos espectroscópicos.



Dados obtidos por EXAFS tem indicado que não há mudança significativa nas estruturas dos sítios ativos das formas Ativa (GAO_{ox}) e Inativa (GAO_{semi}). Experimentos por XANES indicam que a forma ativa também contém Cu(II).

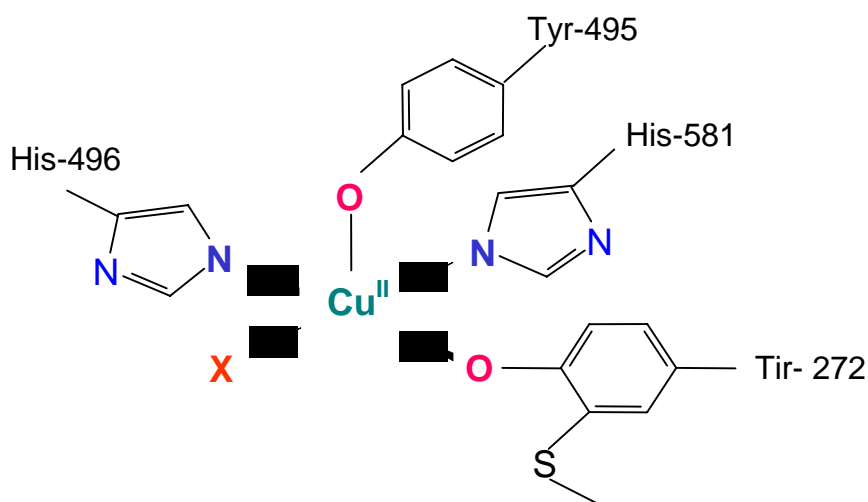


Fig. 4.6. Desenho esquemático do sítio ativo da GAO caracterizado cristalograficamente (X = H₂O ou CH₃COO⁻).

Quando isolada, a GAO “nativa” exibe uma mistura entre as formas ativa e inativa, que Whittaker e colaboradores mostraram que podem ser isoladas independentemente pelo tratamento com agentes redox.

Algumas propriedades espectroscópicas das várias formas da GAO são mostradas na Tab.4.2.

Tab. 4.2. Sumário de algumas propriedades das várias formas da GAO.

Formas	UV-vis	RPE ^a
	$\lambda_{\text{máx}}$, nm ; (ϵ , mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)	
GAO ativa	444 (5194), 810 (3211) ^b	-
GAO inativa	438 (1000), 625 (1167) ^b	$g_{\parallel} = 2,277$, $g_{\perp} = 2,055$, $A_{\parallel} = 175^c$
GAO reduzida ^d	$\approx 450 (\leq 500)$, $\approx 650 (\leq 500)^d$	-
Apo-GAO	$\approx 450, 800^e$	$g = 2,0055^f$

^a Dados de RPE em banda X, com valores de A em unidades de $\times 10^{-4}$ cm⁻¹.

^e Valores mais exatos de λ e ϵ não são descritos.

O tratamento da forma ativa da GAO com $K_4Fe(CN)_6$ resulta na forma inativa da enzima, que é incapaz de executar a reação enzimática, e suas características espectroscópicas são imperturbáveis pela incubação com o substrato ou O_2 .

Na enzima ativa o radical tirosil é antiferromagneticamente acoplado ao átomo de cobre(II) resultando em um complexo silencioso por RPE (estado fundamental diamagnético). A forma inativa da enzima apresenta sinal de RPE de cobre(II) (proteína de cobre do tipo II), enquanto a forma reduzida também não mostra sinal de RPE, uma vez que contém um centro de cobre(I).

Estudos de equilíbrio protônico realizados com a GAO mostram que ocorre o desaparecimento da banda de TCLM fenolato \rightarrow Cu(II) em valores baixos de pH. A adição de bases à enzima, como CN⁻ e Et₃N, faz com que a banda reapareça. Estas observações sugerem a hipótese de um grupo tirosil axial protonado com uma fraca coordenação ao átomo metálico. Isto é reforçado pelas largas distâncias das ligações $O_{\text{fenolato}}\text{-Cu(II)}$ mostradas nas estruturas moleculares da enzima.

Usando as estruturas determinadas por raios X da GAO em suas várias formas, com informações adicionais cinéticas, sondas radicalares e estudos de modelagem computacional, um mecanismo do tipo ping-pong tem sido proposto para a enzima (Fig. 4.7). Na primeira etapa (i) ocorre a substituição da molécula de água (ou acetato) pelo substrato alcoólico. Na etapa seguinte (ii) é proposto que a tirosina axial desprotona o resíduo alcoólico (oxidação do substrato), seguida (iii) pela abstração de um átomo de H metilênico pelo átomo de O do radical tirosil, coordenado equatorialmente. Estudos cinéticos indicam que esta etapa é a determinante no ciclo catalítico. A fase oxidativa é completada (iv) por uma transferência eletrônica intramolecular do ânion-radical cetil formado para o átomo de Cu(II), gerando a forma reduzida da enzima. A segunda fase do mecanismo envolve (v), a oxidação da forma reduzida para a forma ativa por O_2 , que é convertido em H_2O_2 usando os prótons disponíveis do substrato, com subsequente eliminação do aldeído.

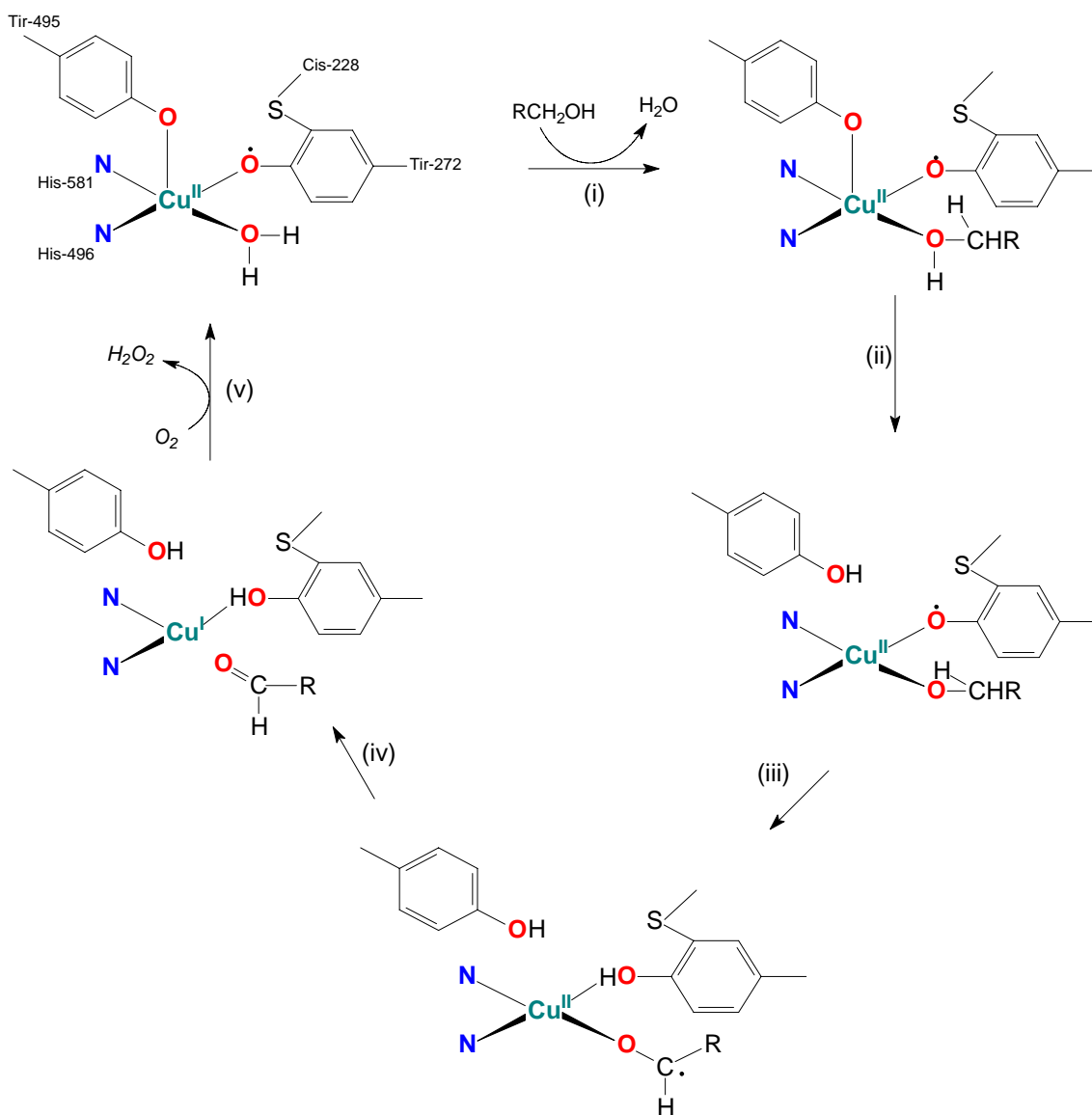


Fig. 4.7. Mecanismo molecular proposto para a GAO.

Muitos complexos, envolvendo ou não uma esfera de coordenação do mesmo tipo da enzima, têm sido descritos como modelos estruturais e funcionais das várias formas da GAO.

Uma estratégia comum para síntese de compostos modelo para a GAO, tem sido a utilização de ligantes multidentados contendo átomos N,O-doadores com um ou mais grupos fenólicos presentes. Alguns destes ligantes são constituídos por unidades como mono e bis(piridil)alquilamina, 1,4,7-triazociclononano (TACN), e N,N'-alquil-bis(salicilimina) (salen), que são bem conhecidas na química dos metais de transição e particularmente úteis no isolamento e caracterização de complexos de cobre.

Os dados obtidos por certos autores enfatizaram a drástica influência da substituição dos resíduos fenólicos nas propriedades redox dos modelos e, também, a importância do controle do pH durante os estudos em solução.

Muitos progressos têm sido obtidos recentemente com relação à reatividade de complexos contendo uma ligação Cu(II)-radical fenoxil (equatorial) na oxidação de álcoois. Entretanto, muito pouco tem sido feito com o intuito de se estudar a participação do resíduo tirosina coordenado axialmente, embora já se saiba da importante influência do mesmo no processo catalítico. Poucos compostos modelo apresentam ligação Cu-O_{fenolato} axial, o que seria um pré-requisito para se correlacionar com a ligação axial que ocorre na GAO. São raros modelos em que ambas as ligações O_{fenolato}-Cu(II) (axiais e equatoriais) sejam encontradas.

Trabalhos recentes têm descrito alguns complexos mononucleares de cobre(II) derivados de ligantes contendo grupos piridil, fenólicos e benzimidazólicos, em que as estruturas de raios X revelam a presença de uma ligação O_{fenolato}-Cu(II) axial.

Dentre estes trabalhos, Neves e colaboradores publicaram recentemente a estrutura de um complexo mononuclear de cobre (II), o único exemplo da literatura, em que dois átomos de O_{fenólicos} doadores estão coordenados axialmente ao átomo de Cu(II) sem desprotonação.

Estas coordenações axiais incomuns nestes complexos descritos anteriormente podem mimetizar a ligação O_{fenolato}-Cu(II) axial na GAO.

4.5 Atividades de Auto-Avaliação

- 1) Por quê os átomos de cobre na deóxi-tirosinase necessariamente precisam assumir o estado de oxidação +1 para que a metaloenzima possa exercer a função de cresolase (formação de orto-cresol)?
- 2) A oxidação da tirosina leva à formação de L-DOPA, o qual posteriormente é transformado em melanina (pigmento presente nas células da pele, cabelos olhos etc.). Esse processo é catalisado pela metaloenzima tirosinase. Pergunta-se: a) Qual o complexo ativo na 1ª etapa (formação de orto-cresol) e qual o mecanismo envolvido nessa etapa. b) Qual o processo envolvido na 2ª etapa (catecolase) da reação? Qual o receptor e qual o doador dos dois elétrons nessa etapa da reação?
- 3) Mostre qual a principal diferença na função do centro Cu^{II}-O₂-Cu^{II} na tirosinase e na catecolase.

Capítulo 5

Hidrolases

Objetivos

- Reconhecer as estruturas das fosfatases ácidas púrpuras e os seus respectivos sítios ativos
- Identificar as propriedades espectrais e magnéticas das fosfatases ácidas púrpuras e prever os estados de oxidação dos metais das suas formas ativa e inativa através dessas informações
- Selecionar modelos ou análogos sintéticos para o sítio ativo das PAPs através do conhecimento das estruturas e propriedades físico-químicas desses modelos
- Identificar nucleases químicas e as suas ações na degradação de ácidos nucleicos

5.1 Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs)

As fosfatases ácidas púrpuras representam um grupo de metaloenzimas pertencentes à classe das hidrolases, que atuam na clivagem de ésteres de fosfato *in vitro* com atividade catalítica ótima em pH ácido. Podem ser encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias.

Uma classe de fosfatases ácidas contendo ferro, de coloração púrpura, foi primeiramente isolada de baço bovino (bsPAP) e fluido de útero suíno (ufPAP). Simultaneamente, pesquisas médicas caracterizaram uma fosfatase ácida de tecidos humanos, resistente a inibição por tartarato, que foi denominada fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) humana do tipo 5 (baseado na mobilidade eletroforética). Apesar dos diferentes nomes atribuídos a estas enzimas, elas apresentam uma significativa homologia seqüencial. Estudos imunológicos também revelam que as PAPs de fontes animais e a TRAP humana são de fato idênticas. Essas metaloenzimas são glicoproteínas monoméricas com peso molecular em torno de 35 KDa, que apresentam uma estrutura monomérica peptídica 90 % similar. Seu sítio ativo consiste de um centro binuclear de ferro com dois estados de oxidação acessíveis: um $Fe^{III}Fe^{II}$ cataliticamente ativo, conhecido como "forma rosa" e outro $Fe^{III}Fe^{III}$ inativo, conhecido como "forma púrpura".

Além da bsPAP, ufPAP e TRAP, outras PAPs de mamíferos vem sendo caracterizadas a partir de diferentes tecidos humanos (baço, placenta, ossos, pulmão), ossos de bovinos, baço de ratos e epidermes.

Apesar de algumas das PAPs estarem bem caracterizadas do ponto de vista físico-químico e estrutural, ainda não se sabe ao certo sua real atividade fisiológica. Por apresentarem atividade

catalítica frente à hidrólise de ésteres de fosfato, acredita-se que essas enzimas possam atuar na degradação das células velhas de eritrócitos. Observou-se também que as PAPs são fontes catalíticas de radicais hidroxila, sendo que os mesmos parecem atuar sobre a matriz óssea. Desta forma, acredita-se que as PAPs atuem na degradação óssea. Já as PAPs encontradas em vegetais parecem ter importância na liberação de fosfato oriundo de compostos organofosforados.

A classe das PAPs oriundas de plantas incluem glicoenzimas diméricas com massa molar em torno de 110 kDa, obtidas de sementes de um tipo de feijão conhecido como “kidney bean” (kbPAP), grãos de soja (sbPAP), batata-doce (spPAP), folhas de espinafre, células de cultura de arroz e *Arabidopsis thaliana*. A melhor estudada é a kbPAP, que contém um sítio heterobimetálico do tipo $Fe^{III}Zn^{II}$ e foi a primeira PAP a ter a estrutura cristalina de raios X resolvida. É interessante ressaltar que a FeZn-kbPAP pode ser convertida para uma forma FeFe ativa, enquanto que as PAPs de útero suíno e de baço bovino (FeFe) podem ser transformadas para a forma FeZn ativa. Uma fosfatase contendo FeMn em seu sítio ativo, descoberta na batata-doce é similar à kbPAP em tamanho, estrutura de subunidades e espectro visível.

Fosfatases púrpuras de bactérias com pH ótimo em torno de pH = 6,0 foram isoladas de *Aspergillus ficuum* (afPAP) e *Neurospora crassa* (ncPAP). O máximo de absorção em 580 nm descrito para a afPAP mostra que essa enzima apresenta uma coloração azul ao invés da cor púrpura. Infelizmente, o conteúdo metálico das PAPs de bactérias ainda é desconhecido. A fosfatase púrpura de *Micrococcus sodenensis* apresenta atividade máxima na região alcalina, porém muito pouco é conhecido sobre as propriedades dessa enzima.

5.1.a. Estruturas Cristalinas por Difração de Raios X

As PAP's foram estruturalmente caracterizadas através da determinação das estruturas cristalinas por difração de raios X da enzima do feijão (kbPAP), da PAP resistente ao tartarato de ratos (ratTRAP e rbPAP) e da ufPAP (Fig.5.1).

A estrutura cristalina determinada para a kbPAP, com uma resolução de 2,65 Å, revela um sítio ativo formado por um íon férrico coordenado aos resíduos de aminoácidos Tyr167, His325 e de maneira monodentada ao grupo carboxilato do aminoácido Asp135. O íon zinco encontra-se ligado aos resíduos His286, His323 e ao átomo de oxigênio da amida do aminoácido Asn201. Os dois íons metálicos são ponteados pelo grupo carboxilato do resíduo Asp164 de maneira monodentada. Completando a esfera de coordenação encontram-se três ligantes exógenos inseridos na estrutura cristalina com base em dados espectroscópicos e de reatividade: um íon hidróxido coordenado ao ferro, uma molécula de água ligada ao zinco e uma ponte μ -hidróxido entre os centros

metálicos. O átomo de Fe^{III} encontra-se em um ambiente octaédrico, a uma distância de 3,26 Å do átomo de Zn^{II} , que apresenta uma geometria octaédrica distorcida.

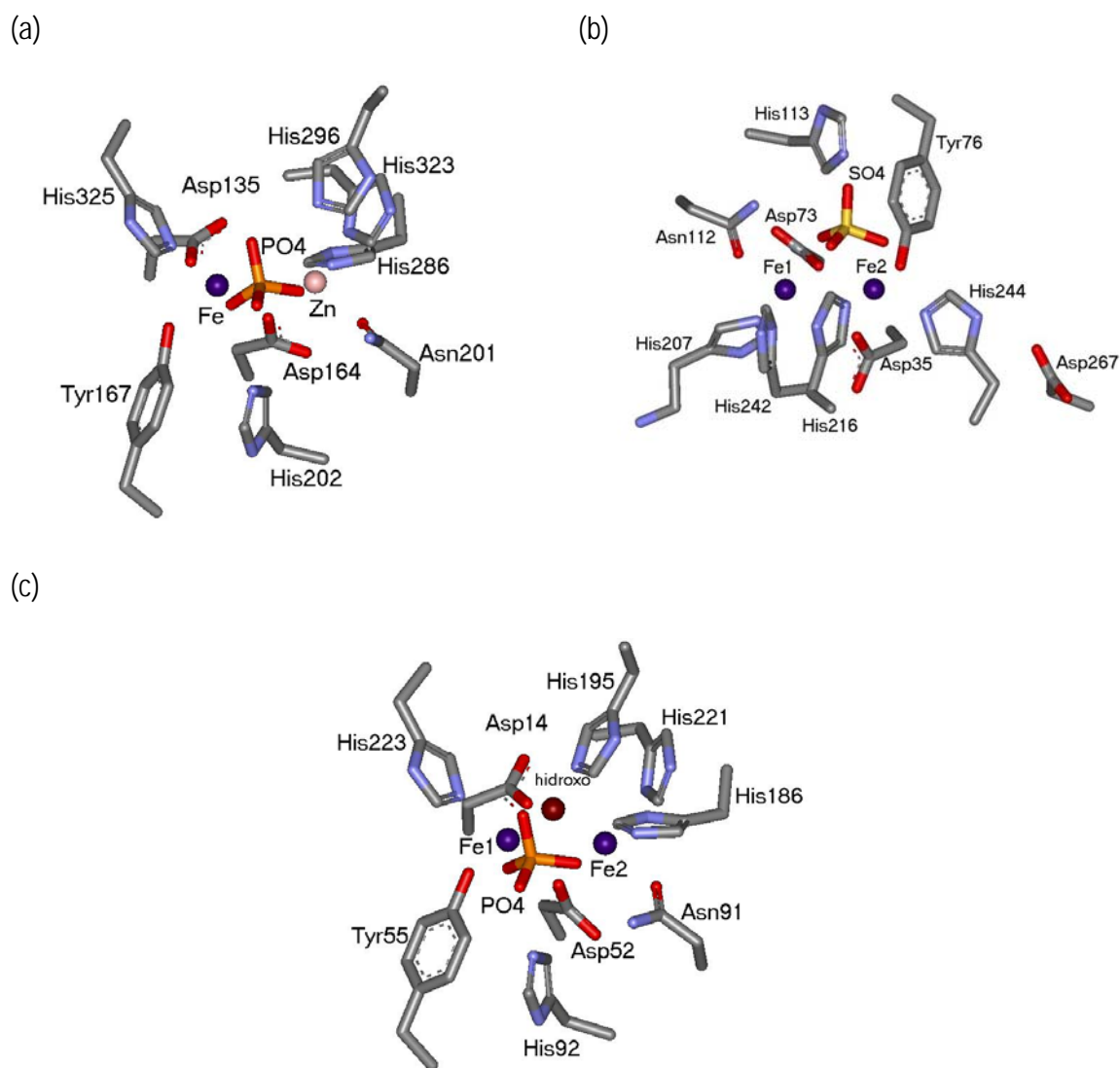


Fig. 5.1. Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAPs: (a) kbPAP, (b) rbTRAP e (c) ufPAP.

A estrutura cristalina da kbPAP contendo fosfato coordenado ao sítio ativo foi também determinada. Sua coordenação ocorre através de dois átomos de oxigênio ligados de forma bidentada como ponte entre os íons metálicos, presumivelmente no lugar das moléculas de água presentes no sítio ativo da enzima sem fosfato. Os dois átomos de oxigênio não coordenados interagem com os resíduos de His202 e His296 através de ligações de hidrogênio; esses aminoácidos sofrem um deslocamento de cerca de 1 Å relativo às suas posições na enzima sem fosfato. A geometria de

coordenação octaédrica para o Fe^{III} pode ser completamente satisfeita pela presença de uma ponte hidróxido. Embora a presença de uma ponte μ -hidróxido não tenha sido determinada com certeza no mapa de densidade eletrônica, sua presença pode ser indicada pelo acoplamento antiferromagnético observado para o derivado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ com fosfato.

A substituição do íon Zn^{II} por Fe^{II} na kbPAP revela que as propriedades espectroscópicas e de reatividade assemelham-se às observadas para as fosfatases de mamíferos. Apesar da pequena homologia seqüencial total, significativas similaridades seqüenciais podem ser identificadas especialmente nas regiões onde se encontram os resíduos do sítio ativo, o que sugere que enzimas de mamíferos e a kbPAP são evolutivamente relacionadas e apresentam uma estrutura tridimensional similar do sítio ativo.

A elucidação das estruturas cristalinas da ufPAP (1,55 Å) e da TRAP de ratos (ratTRAP (2,7 Å) e rbPAP (2,2 Å)) permitiram constatar a similaridade dos sítios ativos das PAPs de mamíferos e da kbPAP, sugerindo que a catálise da reação de hidrólise de fosfatos deva ocorrer através de um mecanismo comum. Um desenho esquemático representando a composição de um sítio ativo comum para a forma ativa das PAPs de mamíferos e de vegetais é mostrado na Fig. 5.2.

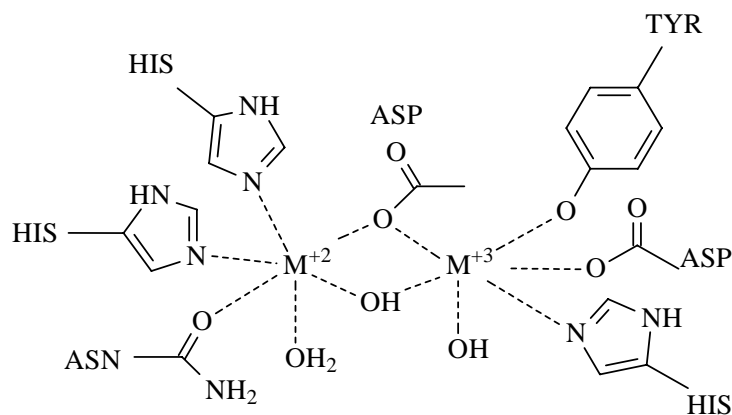


Fig. 5.2. Representação esquemática de um sítio catalítico comum para as PAPs.

As PAPs de mamíferos, são estruturas monoméricas de aproximadamente 35 kDa, contendo dois átomos de ferro em seu sítio ativo. A estrutura da ufPAP refere-se a enzima na forma oxidada, com fosfato coordenado simetricamente aos dois átomos metálicos. A distância Fe-Fe observada foi de 3,31 Å, similar à observada na kbPAP. A ponte μ -hidróxido encontra-se a 2,08 Å dos átomos de Fe^{III} e forma uma ângulo de 105,7° com os mesmos. O mesmo conjunto de aminoácidos que compõem o sítio

ativo da kbPAP foi observado na ufPAP. A estrutura cristalina determinada para TRAP de ratos, na forma oxidada da enzima, revela também a homologia dos resíduos de aminoácidos encontrados nos sítios ativos ufPAP e kbPAP. Na estrutura da rbPAP, resolvida a 2,2 Å, observou-se a presença de uma molécula de SO_4^{2-} e de um átomo de Zn^{II} na estrutura da enzima, proveniente da solução utilizada no processo de cristalização. Um dos átomos de oxigênio do grupo SO_4^{2-} encontra-se coordenado a um dos átomos de Fe^{III} . Através do mapa de densidade eletrônica pode-se observar a presença da ponte μ -hidróxido e de uma molécula de H_2O ou OH^- coordenada a um dos centros de Fe^{III} . A estrutura cristalina da ratTRAP (2,7 Å) mostra a presença de um fosfato inorgânico coordenado de forma bidentada aos dois átomos de ferro. A orientação do grupo fosfato é similar à observada na estrutura da kbPAP.

5.1.b. Espectroscopia UV-Vis e Raman

O sítio ativo das PAPs de mamíferos consiste em um centro binuclear de ferro, como determinado através das estruturas cristalinas, com dois estados de oxidação acessíveis. A forma oxidada da enzima, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, é cataliticamente inativa e apresenta um máximo de absorção entre 550-570 nm ($\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), sendo denominada como "forma púrpura". Na forma reduzida, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$, a enzima conhecida como "forma rosa" apresenta atividade catalítica e absorve em 505-510 nm ($\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Os espectros para a interconversão entre as duas espécies estão mostrados na Fig. 5.3. A banda de absorção observada em ambas as formas da enzima foi atribuída como sendo um processo de transferência do tipo tirosinato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$. Os mesmos valores observados para o coeficiente de absorvidade molar nas formas oxidada e reduzida indicam que o sítio passivo de redução é aquele que não se encontra ligado ao resíduo tirosinato.

A kbPAP apresenta um máximo de absorção em 560 nm ($\epsilon = 3360 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), similar ao observado para as enzimas de mamíferos e para a forma oxidada da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP modificada. Entretanto, a banda de transferência de carga da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -kbPAP não sofre deslocamento para 510 nm após redução, como é observado para as PAPs de mamíferos.

Através da espectroscopia Raman, metaloproteínas contendo resíduos tirosinato como ligantes são facilmente identificadas pela presença de quatro modos do anel tirosina, entre 1600 e 1150 cm^{-1} , que tem sua intensidade aumentada sob excitação na região do visível. A observação desses modos de vibração nos espectros das PAPs de mamíferos (Fig. 5.4) indicam que a forte coloração púrpura observada nessas proteínas deve-se a transições de transferência de carga tirosinato $\rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$.

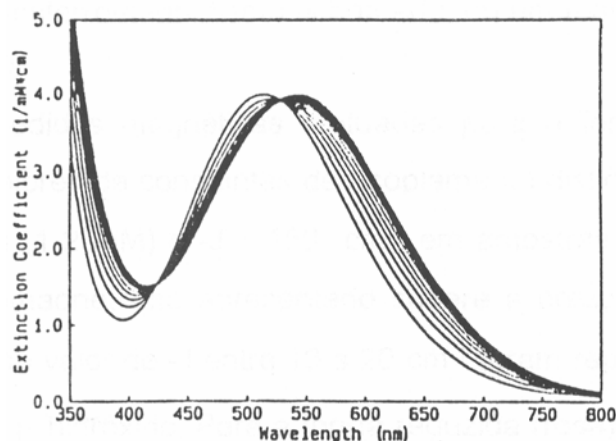


Fig. 5.3. Espectros mostrando a interconversão da forma púrpura (Fe_2^{III} , 550 nm) na forma rosa ($\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$, 505 nm) da UFPAP.

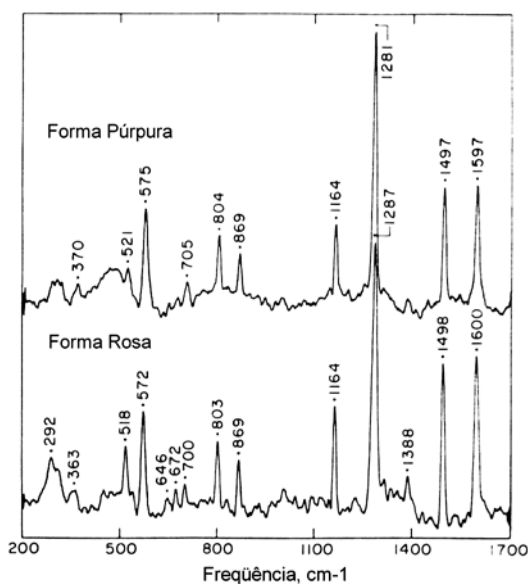


Fig. 5.4. Espectro Raman Ressonante das formas púrpura e rosa da bsPAP.

A preservação do quarteto da tirosina em alta frequência (1600 a 1150 cm^{-1}) na forma rosa indica que a coordenação do resíduo tirosina ao ferro cromofórico (Fe^{III}) é mantida após a redução da enzima. O espectro Raman Ressonante da bsPAP é muito similar ao obtido para a ufPAP. Apesar das posições exatas dos picos não serem idênticas nas duas proteínas, as características gerais do espectro, bem como o pequeno deslocamento da banda em 1281 cm^{-1} para 1287 cm^{-1} após redução, corresponde exatamente aos dados reportados para a ufPAP.

5.1.c. EPR e Magnetoquímica

O comportamento magnético das fosfatases ácidas púrpuras de mamíferos (ufPAP e bsPAP) foi amplamente estudado por susceptibilidade magnética e espectroscopia de EPR. A forma completamente oxidada destas enzimas não apresenta sinal no EPR (EPR-silent) e é aproximadamente diamagnética, com um estado fundamental de spin $S = 0$. Na forma $Fe^{III}Fe^{II}$, essas metaloenzimas apresentam um espectro com sinal rômbo em $g_{\text{médio}} = 1,75$, correspondendo a um estado fundamental de spin $S = \frac{1}{2}$.

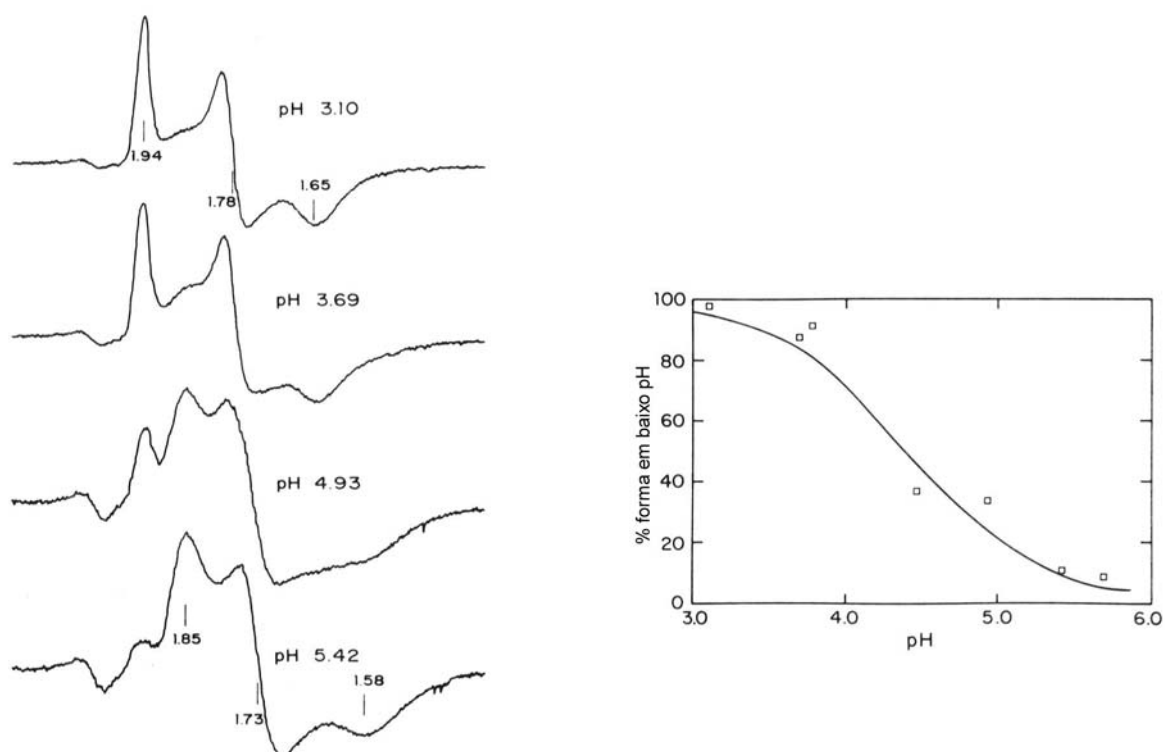


Fig. 5.5. Espectros de EPR em vários valores de pH e gráfico do % da espécie em baixo pH versus pH para a forma de valência mista da bsPAP.

Estudos da dependência do pH no espectro de EPR para a espécie de valência mista da bsPAP (Fig. 5.5) revelaram a presença de duas espécies. Em $pH < 3,5$, observou-se um espectro atribuído a uma espécie rômbo com valores de g iguais a 1,94, 1,78 e 1,65. Em $pH > 5$, o componente principal do espectro apresenta um novo sinal rômbo com valores de $g = 1,85, 1,73$ e 1,58. A forma rosa da bsPAP é instável em $pH > 5,5$; em $pH = 5,42$ o espectro apresenta aproximadamente 10 % da espécie observada em baixos valores de pH. Os espectros mostrados na Fig. 5.5 sugerem a presença de um grupo contendo um próton ionizável ($pK_a \sim 4,4$), com um forte efeito sobre o espectro de EPR.

Recentes estudos de susceptibilidade magnética realizados para a bsPAP revelam um fraco acoplamento antiferromagnético entre os centros de ferro do sítio ativo. Os valores das constantes de acoplamento determinadas tanto para a forma reduzida quanto para a forma oxidada dessa metaloenzima não sofreram influência significativa com a variação do pH na faixa de pH = 3,9 a 5,6. Para a forma reduzida da bsPAP, obteve-se um valor de $J = -13 \text{ cm}^{-1}$ a pH = 5,6, enquanto que para a forma oxidada $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ a pH = 5,1. Valores similares foram relatados para a ufPAP, com $J = -15 \text{ cm}^{-1}$ para a forma oxidada e $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ para a forma reduzida. O espectro de EPR da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -kbPAP modificada é similar ao observado para a forma de valência mista das PAPs de mamíferos. A kbPAP nativa não apresenta sinal na faixa de $g = 1,7$, porém apresenta um sinal em $g = 4,3$ característico de Fe^{III} spin alto com grande rombicidade. Os estudos de susceptibilidade magnética realizados para a Fe_2 -kbPAP revelam um comportamento magnético semelhante ao observado para a bsPAP e ufPAP. A constante de acoplamento determinada para a formas reduzida e oxidada da kbPAP modificada foi de $J = -8$ e $J = -9 \text{ cm}^{-1}$ a pH = 6. Esses resultados, juntamente com os dados cristalográficos dessas metaloenzimas, concordam com a presença de uma ponte do tipo μ -hidróxido entre os sítios metálicos, tanto nas PAPs de mamíferos como na kbPAP.

5.1.d. Espectroscopia Mössbauer

Estudos de espectroscopia Mössbauer- ^{57}Fe da ufPAP e bsPAP enriquecidas com ^{57}Fe , bem como da $^{57}\text{FeFe}$ e $^{57}\text{Fe}^{57}\text{Fe}$ kbPAP modificada demonstram que estas enzimas contém dois átomos de ferro spin alto distintos acoplados antiferromagneticamente ($S = \frac{1}{2}$ para a enzima rosa e diamagnético para a enzima púrpura).

Os espectros Mössbauer, tanto da forma ativa ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$) como da forma inativa (Fe_2^{III}) da UFPAP (Fig. 5.6), revelaram a presença de dois sítios de ferro spin-alto com diferentes ambientes de coordenação. Para a forma ativa, observaram-se valores de deslocamento isomérico (δ) de 1,22 mm/s e desdobramento quadrupolar (ΔE_q) de 2,66 mm/s para o centro de Fe^{II} a 100 K, enquanto o centro de Fe^{III} apresentou valores de deslocamento isomérico de 0,52 mm/s e desdobramento quadrupolar de 1,83 mm/s. Na forma oxidada, observou-se um centro de ferro com deslocamento isomérico de 0,46 mm/s e desdobramento quadrupolar de 2,12 mm/s a 10 K. O segundo centro de Fe^{III} apresentou valores de deslocamento isomérico de 0,55 mm/s com desdobramento quadrupolar de 1,65 mm/s. Os valores obtidos para os parâmetros Mössbauer concordam com um ambiente de coordenação bastante distorcido e rico em oxigênio e nitrogênio.

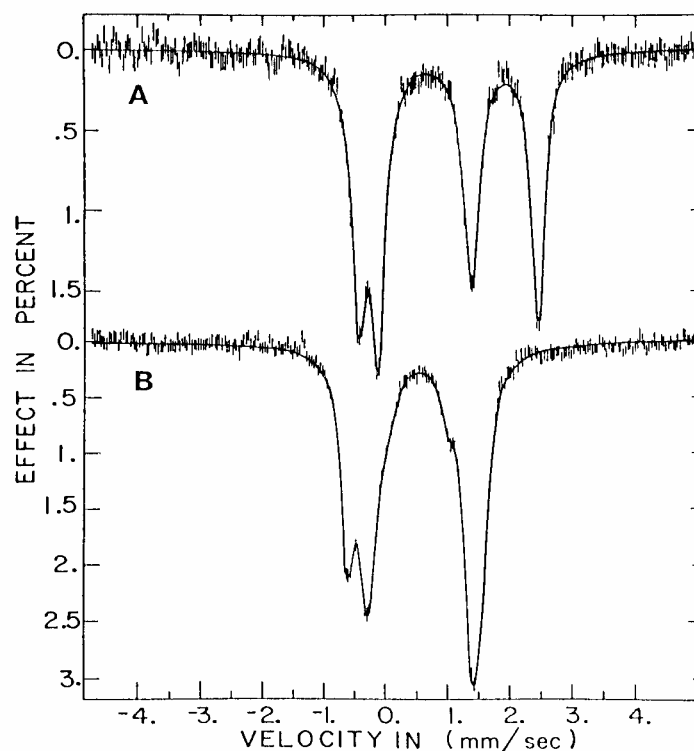


Fig. 5.6. Espectros Mössbauer da forma ativa a 185 K (A) e inativa a 10 K(B) da UFPAP.

5.1.e. Eletroquímica

O comportamento redox da ufPAP foi investigado através de microcoulometria, onde observou-se uma variação do potencial de redução em função do pH. O potencial redox obtido no pH de máxima atividade da enzima (pH = 5) foi de + 367 mV vs NHE, e a pH = 6, E = + 306 mV vs NHE. A influência do pH nos potenciais de redução (60 mV / unidade pH) e o fato da velocidade de transferência de elétrons aumentar com a decréscimo do pH indica a participação de um próton durante o processo de óxido-redução.

5.1.f. Mecanismo

Com base nas estruturas cristalinas e nas propriedades espectroscópicas, magnéticas e eletroquímicas, pode-se constatar uma grande similaridade entre os sítios ativos das diferentes fosfatases ácidas púrpuras, o que sugere que a catálise da reação de hidrólise de ésteres de fosfato ocorra através de um mecanismo comum. Sendo assim, duas propostas similares para o mecanismo de ação das PAPs encontram-se descritas na literatura, uma por Klabunde e colaboradores em 1996

(baseada na estrutura da kbPAP) e a mais recente descrita por Lindqvist e colaboradores em 1999, a qual apresenta-se descrita a seguir.

Na primeira etapa da reação, o grupo fosfato do substrato liga-se à forma reduzida (ativa) da enzima por deslocamento de uma molécula de água e subsequente coordenação ao centro de Fe^{II} (Fig. 5.7). Uma vez coordenado, o átomo de fósforo assume um caráter positivo, o que facilita um ataque nucleofílico do íon hidróxido presente na esfera de coordenação do íon Fe^{III} , que se encontra em posição adequada para um ataque “em linha” sobre o átomo de fósforo. Devido ao fato desse ataque ocorrer do lado oposto ao grupo álcool do substrato, ocorre uma inversão de configuração no átomo de fósforo. O ataque nucleofílico resulta em um estado de transição pentacoordenado, que deve ser estabilizado pelos resíduos de histidina His113 e His216 conservados no sítio ativo. A hidrólise propriamente dita deve ocorrer a partir da protonação do grupo de saída pelo resíduo ácido aspártico Asp267, e subsequente clivagem da ligação P-OR. Ao final da etapa catalítica, o grupo fosfato encontra-se coordenado aos dois centros de ferro de forma bidentada e pode ser deslocado do centro de Fe^{III} por uma molécula de água, em uma reação de substituição.

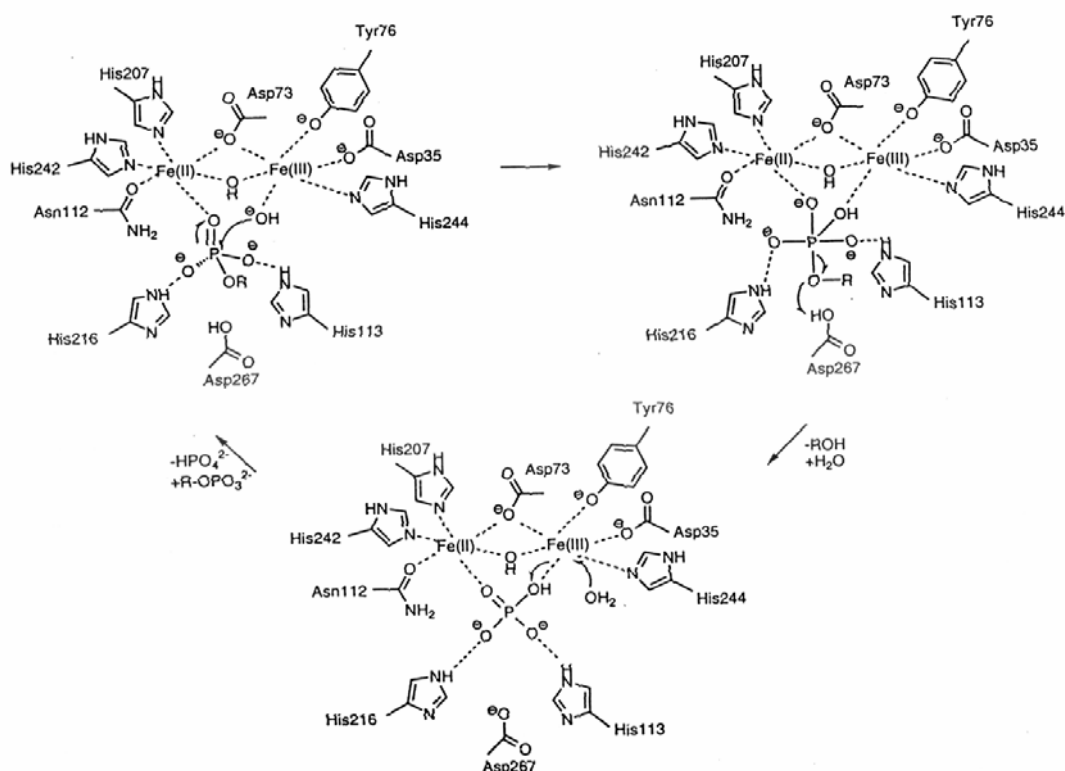


Fig. 5.7. Mecanismo proposto por Lindqvist e colaboradores para a hidrólise de ésteres de fosfato promovida pelas PAPs.

O ataque nucleofílico é facilitado por alguns fatores, de acordo com a proposta de Klabunde e colaboradores, suportando o mecanismo descrito acima. i) O íon Fe^{III} é um forte ácido de Lewis, capaz de gerar facilmente um grupo hidróxido nucleofílico a partir de uma molécula de água coordenada em sua primeira esfera de coordenação; ii) o íon Fe^{II} também age como um ácido de Lewis retirando densidade eletrônica do átomo de fósforo através de sua coordenação a um dos átomos de oxigênio do fosfato; iii) os resíduos de histidina His113 e His216, conservados no sítio ativo, aumentam a retirada da densidade eletrônica do átomo de fósforo através da estabilização da carga negativa sobre os dois átomos de oxigênio do fosfato através de ligações de hidrogênio.

De acordo com o mecanismo proposto por Klabunde e colaboradores para a ação da kbPAP, sugere-se que o resíduo His296 da enzima de plantas (correspondente à His216 na rbPAP) atue como um ácido geral que protona o grupo abandonador. Porém, na rbPAP a existência de um resíduo de ácido aspártico (Asp267) próximo do resíduo de histidina sugere que o Asp267 esteja agindo como um ácido geral. Essa suposição deve-se ao fato de que no pH ácido ótimo para a reação, parece mais provável que o resíduo de ácido aspártico, preferencialmente ao resíduo de histidina, atue como doador na protonação do grupo abandonador. Essa proposição tem sido observada no mecanismo das fosfatases ácidas de alta massa molecular, que também usam um grupo ácido (resíduo aspartato conservado) para a protonação do grupo abandonador.

Sendo assim, com base no mecanismo descrito acima, acredita-se que a principal função dos íons metálicos é agir como um ácido de Lewis em um processo catalítico onde não há o envolvimento de nenhum radical químico. Isto tem sugerido que as PAPs desempenham dupla atividade: como fosfatase e como uma fonte de radicais hidroxila. No entanto, a verdadeira função fisiológica das PAPs ainda permanece não estabelecida.

5.1.g. Complexos Modelo

Até o momento em que a primeira estrutura cristalina das PAPs foi obtida, muito se inferiu sobre a composição do seu sítio ativo através do estudo de complexos modelo, comparando-se as propriedades físico-químicas obtidas diretamente da enzima com as obtidas para os modelos. Com esse objetivo, dezenas de complexos com ligantes contendo átomos de oxigênio e de nitrogênio doadores encontram-se descritos na literatura. Assim, quando as estruturas de raios X foram determinadas, confirmaram-se muitas das propostas previamente reportadas.

Atualmente vem-se buscando, através do estudo de compostos modelo, maiores informações sobre a reatividade das PAPs, procurando auxiliar na comprovação de seu mecanismo de ação bem como na busca de seu papel nos sistemas vivos.

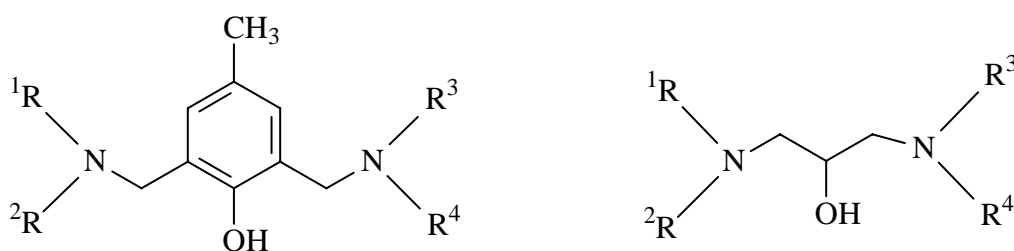


Fig. 5.8. Estrutura geral para ligantes binucleantes, onde R corresponde aos braços pendentes contendo os grupos doadores coordenantes.

A elucidação das estruturas cristalinas dessas metaloenzimas, que permitiu desvendar o sítio ativo e descobrir um ambiente de coordenação comum entre as diversas PAPs (Fig. 5.2), forneceu subsídios para o desenvolvimento de ligantes mais elaborados para a mimetização desse sítio ativo e conseqüentemente das suas propriedades. Nesse sentido, uma das estratégias mais promissoras para o desenvolvimento desses ligantes é a utilização de um esqueleto binucleante como mostrado na Fig. 5.8, que proporciona a formação de pontes do tipo μ -alcóxido ou μ -fenóxido e de braços pendentes contendo grupos doadores que mimetizam os resíduos de aminoácidos coordenados aos centros metálicos no sítio catalítico. Alguns dos principais ligantes utilizados na síntese de modelos para as PAPs são mostrados na Fig. 5.9. Dentre estes, destacam-se o H₂BPBPMP e H₂BTPPNOL, que além de proporcionarem um caráter não-simétrico ao complexo, contém apenas um grupo fenol, aproximando-se bastante do ambiente de coordenação presente no sítio ativo das PAPs, quando comparados aos demais ligantes descritos até o momento. O complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP)(OAc)₂][ClO₄] (onde BPBPMP é a forma desprotonada do ligante H₂BPBPMP), apresenta um potencial redox de + 380 mV vs NHE, similar ao observado na UfPAP. Entretanto, suas propriedades cromofóricas são diferentes das encontradas na enzima. Já os complexos [Fe₂^{III}(BTPPNOL)(OAc)₂]²⁺ e [Fe^{III}Fe^{II}(BTPPNOL)(OAc)₂]⁺ (onde BTPPNOL é a forma desprotonada do ligante BTPPNOL) podem ser considerados análogos para as propriedades cromofóricas das PAPs nas formas oxidada e reduzida, respectivamente. Porém, o potencial redox desses complexos difere em 300 mV do potencial determinado para a UfPAP.

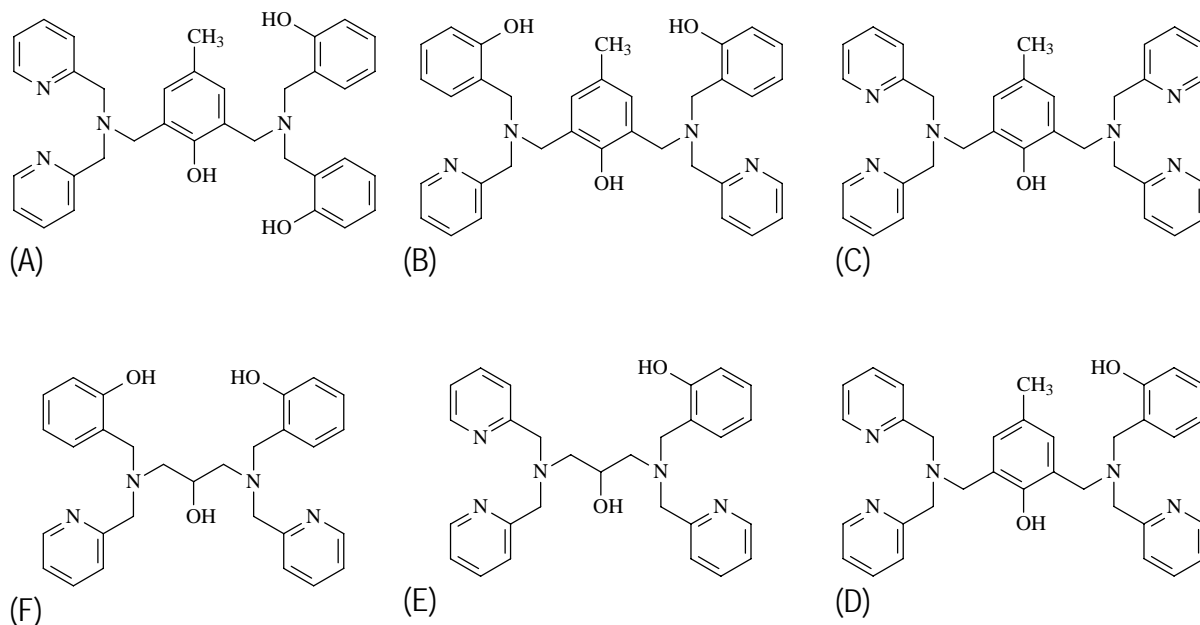


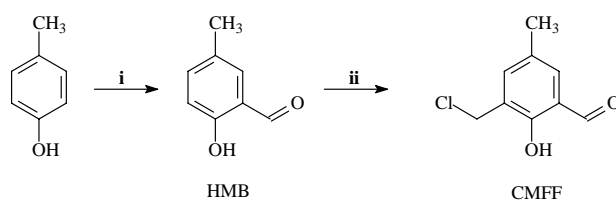
Fig. 5.9. (A) = H₃BPBBMP, (B) = H₃BBPMP, (C) = HBPMP, (D) = H₂BPBPMP, (E) = H₂BTPPNOL, (F) = H₃BBPPNOL

A seguir, faremos a descrição completa de todas as sínteses e propriedades físico-químicas do complexo [Fe^{III}Fe^{II}(BPBPMP)(OAc)₂]ClO₄, o qual possui apenas um grupo fenol ligado de forma terminal ao sítio de Fe(III) da mesma forma que o encontrado nas PAPs. Para tanto, seguiremos o esquema apresentado na Tab. 1.2.

1. Síntese do ligante H₂BPBPMP

1.1 - Síntese do 2-clorometil-4-metil-6-formilfenol, CMFF

O composto precursor CMFF foi preparado de acordo com o seguinte esquema:

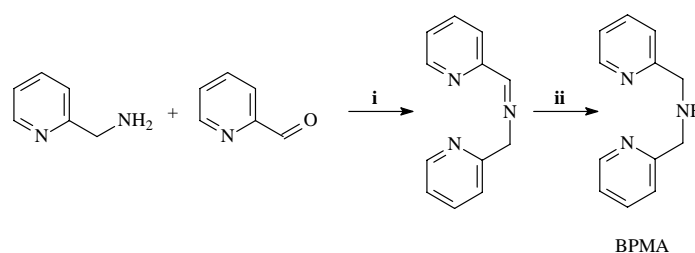


Numa primeira etapa (i), realizou-se uma reação de formilação do p-cresol, baseada no procedimento descrito na literatura para a reação de Reimer-Tiemann. Na etapa (ii), o produto da etapa (i), 2-hidroxi-5-metoxibenzaldeído – HMB, foi submetido a uma reação de clorometilação (formaldeído /

ácido clorídrico conc.) formando o produto desejado, CMFF, com rendimento de 70 %. Os compostos obtidos nas duas etapas foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear de próton (^1H NMR).

1.2 - Síntese do N-bis-(2-piridilmetil)amina, BPMA

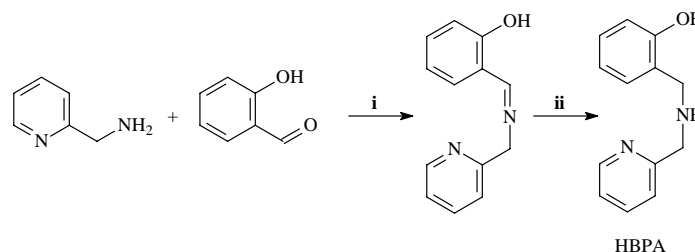
A síntese do BPMA foi realizada de acordo com o esquema abaixo:



Na primeira etapa (i) realizou-se uma reação de condensação de 2-(aminometil)piridina com piridina-2-carboxialdeído em metanol a 0 °C. Após uma hora de reação, a solução reacional foi reduzida (etapa ii) por hidrogenação catalítica ($\text{H}_2 = 60$ psi, Pd/C 5%) durante 12 horas. O produto BPMA foi obtido após filtração do catalizador e evaporação do solvente, sem qualquer tipo de purificação, com rendimento quantitativo. Sua caracterização foi realizada através de ^1H NMR.

1.3 - Síntese do N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina, HBPA

O precursor HBPA foi preparado de acordo com o esquema abaixo, seguindo o procedimento descrito na literatura.



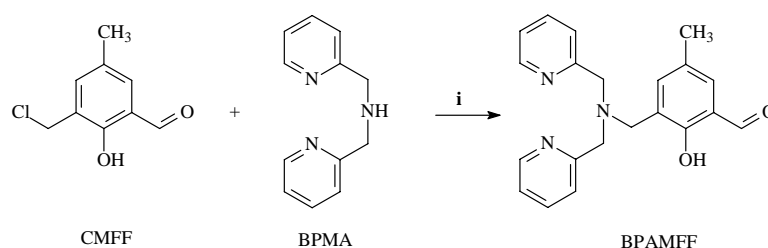
Na etapa i, realizou-se uma reação de condensação entre aldeído salicílico e 2-(aminometil)piridina em metanol a temperatura ambiente. Em seguida (etapa ii) adicionou-se borohidreto de sódio em quantidade estequiométrica, promovendo a redução da imina para a correspondente amina, HBPA. Após extração e evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelo-

claro que precipitou em seguida, formando um sólido cristalino de coloração amarelo-pálida, com 80 % de rendimento. O HBPA foi caracterizado por IR e ^1H NMR.

1.4 - Síntese dos Compostos Intermediários

1.4.1 - Síntese do 2-[N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-formilfenol – BPAMFF

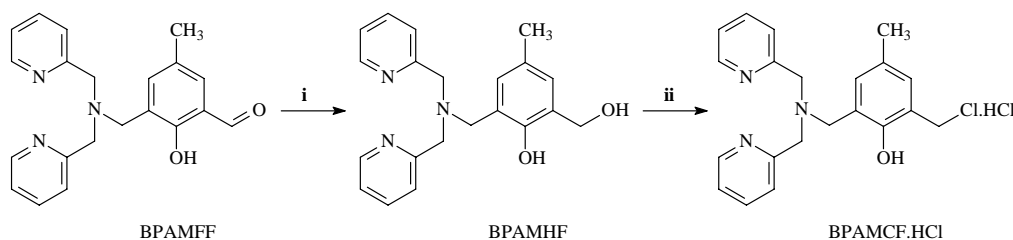
A síntese do BPAMFF foi realizada através de uma reação de substituição nucleofílica do cloreto no CMFF pela amina secundária do BPMA, conforme mostra o esquema abaixo:



Uma solução de BPMA com trietilamina em diclorometano foi gotejada sobre uma solução do CMFF no mesmo solvente, sob agitação, a 0 °C. Em seguida, a mistura foi deixada reagir por mais 3 horas a temperatura ambiente (25 – 30 °C). Então lavou-se exaustivamente a solução reacional com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10 %; a fase orgânica foi separada, seca e o solvente evaporado, restando um óleo amarelo que precipitou pela adição de isopropanol. O BPAMFF foi obtido com 77 % de rendimento, e caracterizado por IR e ^1H NMR.

1.4.2 - Síntese do 2-[N-bis(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-clorometilfenol hidrocloreto – BPAMCF.HCl

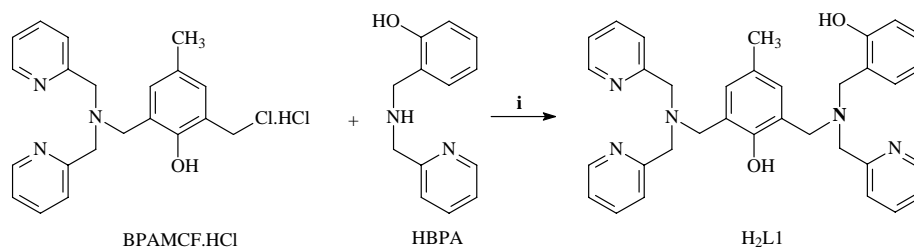
A preparação do BPAMCF.HCl foi realizada em duas etapas, como mostra o diagrama abaixo:



Na etapa (i) o BPAMFF foi reduzido na presença de borohidreto de sódio em metanol a temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, o produto foi purificado por extração com diclorometano e solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10%; a fase orgânica foi seca e o solvente evaporado a pressão reduzida, restando um óleo viscoso incolor (BPAMHF). Na segunda etapa (ii), cloreto de tionila (20 % excesso) foi gotejado sobre uma solução do BPAMHF em diclorometano. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto restante deixado sob vácuo (0,1 mmHg, 50 °C) durante 12 horas. Os produtos BPAMHF e BPAMCF.HCl foram obtidos com rendimento quantitativo e caracterizados por ^1H NMR.

1.5 - Síntese do Ligante final (H_2BPBPMP ou H_2L) - 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzi)(2-piridilmetil)aminometil]fenol – $\text{H}_2\text{L1}$

O ligante $\text{H}_2\text{L1}$ foi preparado pela reação de substituição nucleofílica do cloreto no BPAMCF pela amina secundária do precursor HBPA, conforme ilustra o seguinte esquema:



Uma solução de HBPA e trietilamina em diclorometano foi gotejada sobre uma solução do BPAMCF.HCl no mesmo solvente, sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi deixada reagir sob refluxo por 24 horas. Após resfriada, lavou-se a solução reacional com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10 %. A fase orgânica foi separada, seca e o solvente evaporado, restando um óleo amarelo-pálido, sobre o qual adicionou-se acetona provocando a precipitação do produto. O ligante $\text{H}_2\text{L1}$ foi obtido com rendimento de 80 % e caracterizado por IR, ^1H NMR.

2. Síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ (1)

O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ pode ser obtido pela reação direta do ligante H_2BPBPMP com $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de acetato de sódio, em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$, sob atmosfera de argônio.

3. Estrutura de raios-X do complexo (1)

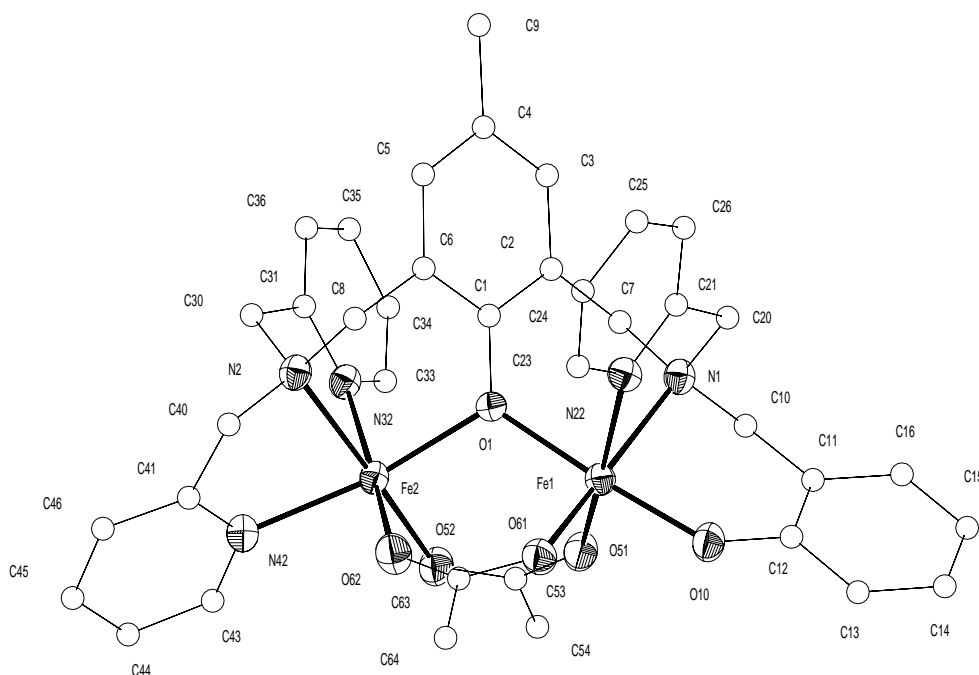


Fig. 5.10. Estrutura de raios-X do cátion complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]^+$ (1)

A estrutura de raios-X do cátion $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]^+$ está apresentada na Fig. 5.10.

O complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2](\text{ClO}_4)$ apresenta uma estrutura binuclear não simétrica com os dois átomos de ferro hexacoordenados presentes em dois estados de oxidação ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$). Os centros metálicos são unidos por uma ponte fenóxido oriunda do ligante não simétrico H_2BPBPMP e duas pontes carboxilato provenientes de dois grupos acetato. Completando o ambiente de coordenação do Fe1 tem-se um $\text{N}_{\text{piridínico}}$, um $\text{N}_{\text{amínico}}$ e o $\text{O}_{\text{fenólico}}$ terminal. Coordenados ao Fe2 tem-se dois $\text{N}_{\text{piridínicos}}$ e um $\text{N}_{\text{amínico}}$. Os braços do ligante ocupam uma coordenação facial sobre os átomos de ferro.

O $\text{O}_{\text{fenólico}}$ ponte está coordenado assimetricamente aos dois centros metálicos, com distâncias de ligações ($\text{Fe1-O1} = 2,005(3)$ e $\text{Fe2-O1} = 2,102(3)$ Å) levemente maiores do que as observadas em outros complexos de valência mista $\{[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPMP})(\text{Opr})_2]^{2+}$ ⁶⁸ $\text{Fe3-O1} = 1,943(2)$; $\text{Fe2-O1} = 2,090(2)$ Å}. Ocupando uma posição trans ao $\text{O}_{\text{fenólico}}$ ponte, tem-se coordenado ao Fe1 o $\text{O}_{\text{fenólico}}$ terminal, estando a 1,902 Å do centro metálico. Esta distância é maior do que a observada no complexo $[\text{Fe}_2(\text{BBPMP})(\text{OAc})_2]^+$ (média $\text{Fe-O}_{\text{fenólico}} = 1,855$ Å). No Fe2 tem-se um $\text{N}_{\text{piridínico}}$ trans ao $\text{O}_{\text{fenólico}}$ ponte. O $\text{N}_{\text{piridínico}}$ está a 2,143 Å do centro de Fe2. Esta distância é bastante similar aquela

observada no complexo $[\text{Fe}_2(\text{BBPMP})(\text{OAc})_2]^+$ (2,141 Å). Coordenado ao átomo de Fe2 tem-se ainda um segundo $\text{N}_{\text{piridínico}}$ (2,217(3) Å) com comprimento de ligação idêntico ao $\text{N}_{\text{amínico}}$ (2,219(3) Å). O $\text{N}_{\text{piridínico}}$ coordenado ao Fe1 está trans ao O51 do grupo acetato ponte e apresenta comprimento de ligação (2,192 Å) levemente menor que o seu equivalente coordenado ao Fe2. O $\text{N}_{\text{amínico}}$ ligado ao Fe1 possui praticamente o mesmo comprimento de ligação observado na ligação N2-Fe2. Os oxigênios dos grupos acetatos estão coordenados com distâncias de ligações diferentes aos átomos de Fe1 e Fe2 (Fe1-O51 = 2,022(3); Fe1-O61 = 1,963(3); Fe2-O62 = 2,127(3); Fe2-O52 = 2,033(3) Å). As médias de ligações em torno dos centros metálicos são superiores às médias observadas no complexo $[\text{Fe}_2(\text{BBPMP})(\text{OAc})_2]^+$ (2,028 e 2,027 Å). A distância Fe...Fe (3,5041 Å) em **(1)** é mais longa do que a observada no análogo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPMP})(\text{OPr})_2]^{2+}$ (3,365 Å) bem como o ângulo Fe-O-Fe de 117,14 para **(1)** é maior que o valor de 113,1 encontrado para $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BPMP})(\text{OPr})_2]^{2+}$. Contudo, estes parâmetros são similares aos observados para o análogo simétrico $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OAc})_2]^{2+}$ (Fe...Fe = 3,528 Å e Fe-O-Fe = 118,3 °). Analisando estes dados, verifica-se que o aumento do ângulo Fe-O-Fe provoca um aumento no comprimento de ligação Fe...Fe.

Conforme descrito acima, o centro Fe(1) encontra-se coordenado por um oxigênio fenólico e um nitrogênio piridínico e o centro Fe(2) por grupamentos piridina os quais mimetizam os resíduos de His e Tyr na enzima. A distância Fe(1)-O_{fenolato} = 1,902 Å é um pouco menor mas comparável àquela encontrada na uteroferrina (1,98 Å).

4. Espectroscopia UV-Vis e Espectroeletróquímica

A espectroeletróquímica do complexo **(1)** (Fig. 5.11) mostra a transformação da espécie de valência mista na espécie oxidada. Neste processo, o máximo de absorção muda de 551 nm para 633 nm e verifica-se a diminuição da absorvância entre 1000 e 1400 nm, o que comprova a presença da transição de intervalência na espécie de valência mista.

Devido a espécie oxidada apresentar um coeficiente de absorvidade molar similar ao da espécie de valência mista, atribui-se apenas a presença de transições de TCLM fenolato → Fe^{III} na espécie de valência mista. A manutenção do coeficiente molar de extinção também nos confirma que o fenolato terminal se encontra ligado ao centro de Fe^{III} o qual não é reduzido durante a transformação Fe₂^{III} → Fe^{II}Fe^{III}, fenômeno também observado na BSPAP e uteroferrina.

O potencial redox observado pelo gráfico de Nernst é de -0,008 V vs Fc/Fc⁺ (0,39 vs. NHE) com um total de 1.05 elétrons transferidos.

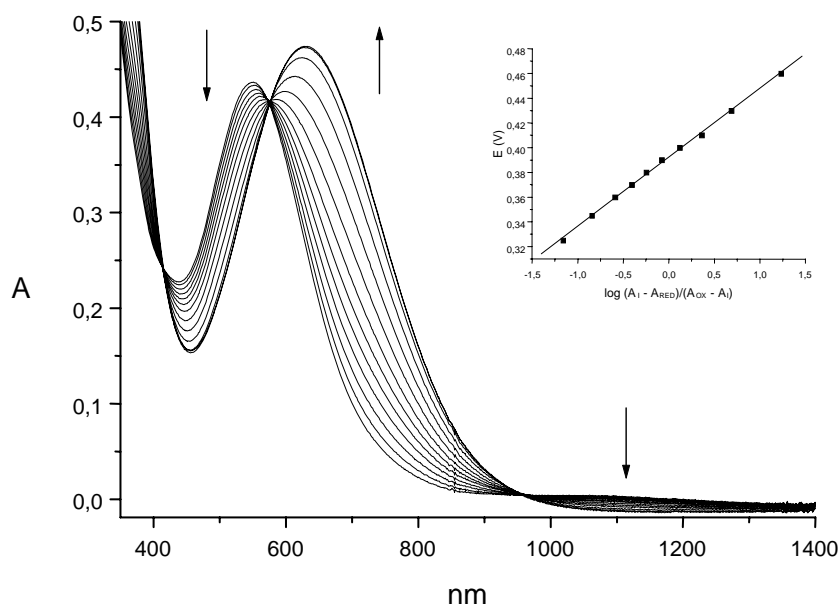


Fig. 5.11. Espectroeletróquímica do complexo (1). Eletrodo de trabalho: mini-tela de ouro; eletrodo auxiliar: platina; eletrodo de referência: ESC; solvente: CH_3CN ; eletrólito suporte: TBAPF_6 ; potenciais aplicados: 0,325; 0,345; 0,360; 0,370; 0,380; 0,390; 0,400; 0,410; 0,430; 0,460 V. Potenciais são dados versus ENH.

Esse valor é similar ao encontrado na fosfatase ácida púrpura (uteroferrina) o qual é de 0,37 V vs. NHE em pH 5. Portanto, trata-se de um excelente análogo sintético para as propriedades redox da enzima.

Considerando que o ligante H_2BPBPMP apresenta dois grupos distintos de coordenação (macio do lado das piridinas e duro do lado contendo fenol), torna-se importante a síntese de complexos heterodinucleares contendo um metal macio (Zn^{2+}) e um metal duro (Fe^{3+}). Assim, pôde-se facilmente sintetizar o complexo $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2](\text{ClO}_4)$ como um modelo estrutural e funcional para o sítio ativo da PAP obtida do feijão (KBPAP).

5.2 Nucleases Químicas

Nas últimas décadas, os químicos bioinorgânicos também têm se empenhado no estudo dos íons metálicos relacionados à medicina, ou seja, nos distúrbios causados pela falta ou pelo excesso desses íons nos sistemas vivos, bem como no desenvolvimento de novas drogas para a cura de doenças.

Nesse contexto, uma das áreas de grande interesse é a do desenvolvimento de novos complexos capazes de hidrolisar cataliticamente algumas das mais importantes biomoléculas, tais como as proteínas, os fosfolípidios, os anidridos de fosfato (ATP), os ésteres de fosfato e os ácidos: desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA). Como mencionado anteriormente, na natureza este tipo de reação é mediado por uma classe de enzimas denominadas hidrolases. Nessa seção, as hidrolases de interesse são as nucleases, enzimas capazes de clivar as ligações fosfodiésteres das moléculas de DNA e RNA. Fazem parte dessa classe de enzimas a DNA polimerase I, a transcriptase reversa, a P1 nuclease, a EcoRV endonuclease, as ribozimas, entre outras. As nucleases, também conhecidas como fosfodiesterases, pertencem a uma classe de enzimas que catalisa a clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster por um fator de 10^{12} vezes relativo à reação não catalisada. As constantes de primeira ordem para a hidrólise de uma ligação fosfodiéster na simples-fita e na dupla-fita de DNA estão estimadas em 6×10^{-9} e $6 \times 10^{-10} \text{ min}^{-1}$, respectivamente, sob condições fisiológicas.³⁴ Para a hidrólise das ligações fosfodiésteres no DNA, o tempo de meia-vida é estimado em 130.000 anos, a pH neutro e 25 °C, enquanto que no RNA estima-se ser de apenas quatro anos sob as mesmas condições. A existência de ligações tão resistentes à hidrólise nestes biopolímeros evidencia a necessidade natural de se manter o código genético durante todo o processo evolutivo e, em contrapartida, a evolução dessa classe de enzimas representa a necessidade do uso de DNA como material genético.

Embora um grande número de nucleases naturais seja conhecido, o desenvolvimento de nucleases sintéticas tornou-se de grande utilidade e interesse. Um desses interesses pode ser exemplificado pelo uso desses compostos como enzimas de restrição sintéticas, ou seja, compostos capazes de reconhecer pequenas seqüências na dupla hélice do DNA e catalisar a hidrólise da dupla fita nestes sítios auxiliando, por exemplo, na elucidação da seqüência do genoma humano. Podem também ser bastante úteis como sondas conformacionais e nas determinações estruturais de proteínas e ácidos nucleicos. Um terceiro objetivo na obtenção desses compostos é a constante busca da elucidação do papel de íons metálicos nos sistemas naturais, bem como no planejamento de hidrolases sintéticas mais efetivas.

As primeiras nucleases químicas obtidas ficaram conhecidas como agentes oxidativos, pois estes compostos de coordenação clivavam ácidos nucleicos, sob condições fisiológicas, por ataque oxidativo sobre o anel ribose, ou sobre o grupamento desoxirribose. O primeiro composto de coordenação que demonstrou ter uma eficiente atividade nucleolítica foi o complexo 1,10-fenantrolina-cobre(II) estudado por Sigman e colaboradores. Outros exemplos de nucleases químicas oxidativas surgiram e são derivados de Fe-EDTA, várias metaloporfirinas, complexos octaédricos de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina e Bleomicina. A utilização desses agentes oxidativos nas várias aplicações descritas

acima representa uma prova da importância de novas nucleases sintéticas. Entretanto, embora agentes de clivagem oxidativa sejam muito eficientes, sua aplicação é limitada por duas razões: (a) os mecanismos de clivagem oxidativa freqüentemente geram radicais livres, os quais geralmente são indesejáveis, e (b) não geram fragmentos consistentes com aqueles produzidos por nucleases naturais, assim, ácidos nucléicos clivados oxidativamente não podem ser enzimaticamente religados, o que limita a utilização desses agentes em biologia molecular, uma área em pleno crescimento. Sendo assim, uma nuclease sintética que não tenha estes inconvenientes torna-se de preferencial interesse e representa uma área de grande desafio, pois esses compostos têm, por definição, que ser capazes de manipular a energia do estado de transição, diminuindo a energia de ativação da reação, como realizado pelas enzimas.

Atualmente, as estratégias utilizadas para o desenvolvimento de novas nucleases sintéticas podem ser obtidas dos sistemas naturais, que em sua maioria são enzimas que apresentam dois íons metálicos em seu sítio ativo e, portanto, os utilizam no processo catalítico. Acredita-se que um dos centros metálicos seja utilizado para ativar o substrato e que o outro atue como um ácido de Lewis, diminuindo o pKa da água coordenada e estabilizando a carga acumulada sobre o grupo abandonador. Acredita-se também que ambos atuem juntos ancorando o substrato e fornecendo a estabilização eletrostática no estado de transição pentacovalente. Entretanto, deve-se salientar que a presença de dois íons metálicos não é uma exigência universal, uma vez que algumas nucleases, incluindo a ribonuclease H e a *EcoRI* endonuclease, necessitam de apenas um único íon metálico para suas atividades catalíticas.

Tendo em vista todos os fatores apresentados acima, novos compostos capazes de clivar ligações fosfodiésteres e/ou DNA têm sido investigados nas últimas décadas. Vários são os tipos e o número de íons metálicos utilizados nestes sistemas, sendo os mais estudados complexos com Ni^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}, Co^{II}, Fe^{III} e alguns lantanídeos.

Complexos mono- e bi-nucleares utilizando-se vários tipos de ligantes têm sido amplamente investigados quanto à sua capacidade em hidrolisar ésteres de fosfato.

Baseados em sistemas modelos e em hidrolases naturais, Sargeson e colaboradores concluíram que um íon metálico no sítio cataliticamente ativo de uma hidrolase sintética deve ser capaz de:

- (a) fornecer dois sítios lábeis *cis*-orientados para coordenar ambos o substrato e uma molécula de água (figura 6),
- (b) reduzir o pKa de uma molécula de água coordenada, isto é fornecer um nucleófilo hidróxido ligado ao metal em pH próximo de neutro,
- (c) ativar o substrato através de um ataque nucleofílico e/ou estabilizar o estado de transição,
- (d) liberar os produtos a uma velocidade razoável.

Portanto, atualmente, estes quatro itens representam as bases para o desenvolvimento de novos complexos que possam agir como nucleases químicas.

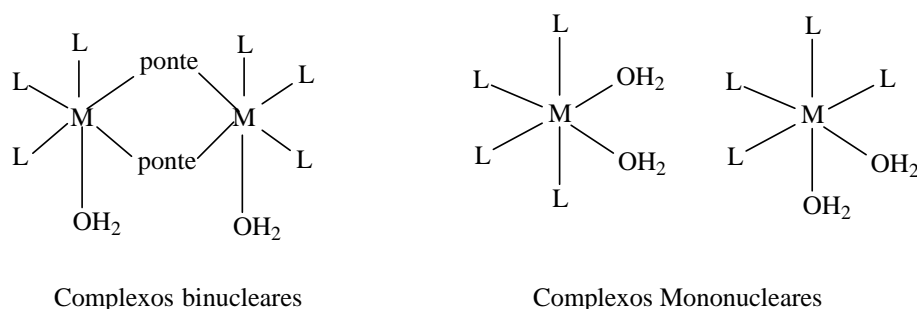


Fig. 5.12. Representação esquemática de sítios lábeis *cis*-orientados em complexos mono e binucleares.

5.3. Complexos Modelos para as Hidrolases

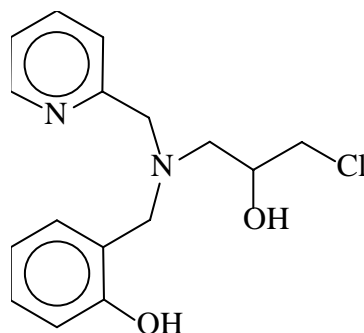
Inspirados nos estudos realizados com as fosfohidrolases abordadas acima, os químicos bioinorgânicos têm sintetizado complexos modelos enfocando os seguintes pontos característicos dessas enzimas: a presença de sítios catalíticos binucleares separados por distâncias médias de 3,5 Å e unidos, no caso das PAPs, por grupamentos ponte exógenos (hidróxido modelado); a assimetria dos centros metálicos devido aos diferentes resíduos de aminoácidos que fornecem átomos de oxigênio e nitrogênio para a interação com os metais e a disponibilidade de sítios lábeis necessários ao processo catalítico.

No caso de modelos para as PAPs, para satisfazer a condição de dois sítios metálicos separados por uma distância média, o uso de ligantes binucleantes tem sido uma estratégia promissora e bem sucedida, devido ao seu efeito quelante e à formação previsível de centros binucleares conforme abordado na Seção 5.1.

5.3.a. Reatividade frente ao DNA

A seguir apresentaremos um complexo modelo de uma nuclease sintética e a sua reatividade frente a ésteres de fosfato e o DNA.

O complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**2**), apresenta uma estrutura cristalina (Fig. 5.13) centrosimétrica, composta por dois átomos de Fe^{III} hexacoordenados, unidos por duas pontes alcoxo, provenientes das duas moléculas do ligante $\text{H}_2\text{BPCINOL}$, mostrado abaixo:



$\text{H}_2\text{BPCINOL}$

Cada um dos ligantes também coordena-se terminalmente a um dos átomos de Fe^{III} através do oxigênio fenólico, do nitrogênio amínico e do nitrogênio piridínico. Este conjunto de átomos ocupa uma posição meridional no ambiente de coordenação do centro metálico. Este tipo de coordenação só foi observado em poucos complexos binucleares de ferro com ligantes semelhantes. Ligantes contendo aminas terciárias coordenadas em complexos análogos, geralmente apresentam este conjunto de átomos coordenados facialmente. O ambiente de coordenação dos átomos de Fe^{III} é completado por uma molécula de H_2O coordenada a cada um dos átomos metálicos. **As moléculas de H_2O apresentam uma coordenação *anti* entre si**, diferentemente de outros complexos binucleares de ferro, os quais apresentam moléculas de solvente em configuração *syn*. A configuração *anti* é imposta pela coordenação meridional do ligante.

Os oxigênios fenólicos encontram-se trans aos nitrogênios piridínicos, formando um ângulo de $164,58(9)^\circ$ com estes e ocupando o eixo axial do centro metálico. Em complexos análogos, os oxigênios fenólicos geralmente apresentam-se trans aos grupos pontes. Mesmo assim, o comprimento de ligação $\text{Fe}-\text{O}_{\text{fenólico}}$ ($1,886(2) \text{ \AA}$) encontra-se na faixa observada para complexos contendo fenolatos em posição trans a outros átomos de oxigênio ($1,850-1,920 \text{ \AA}$). Formando o plano equatorial dos íons Fe^{III} encontram-se o nitrogênio amínico, os dois oxigênios alcoxo que formam as pontes e a molécula de H_2O .

As moléculas de H_2O estão a $2,029(2) \text{ \AA}$ dos átomos metálicos, encontrando-se trans aos oxigênios alcoxo das pontes. O nitrogênio amínico também está trans a um dos grupos alcoxo ponte,

apresentando-se a 2,189(2) Å do átomo de Fe^{III}. Já o nitrogênio piridínico encontra-se mais próximo do centro metálico (2,162(2) Å) do que o nitrogênio amínico.

Como em outros complexos que apresentam um anel de 5 membros, no anel formado pelo conjunto de átomos Fe1-N21-C22-C2-N1, o ângulo entre as ligações N21-Fe1-N1 (77,99(9)°) difere significativamente de 90°. Como resultado, verifica-se a distorção imposta ao centro metálico, desviando-se deste modo de um octaedro perfeito.

As pontes alcoxo não estão ligadas simetricamente aos dois centros de Fe^{III} (Fe1-O2 = 1,9613(19) e Fe2-O2 = 2,0569(19) Å). A distância média das ligações Fe-O_{alcoxo} (2,009(19) Å) está na faixa observada para outros complexos contendo pontes alcoxo e hidroxó (1,937(6)-2,055(6) Å). A ligação assimétrica do O_{alcoxo} com os dois centros metálicos pode ser explicada pelo efeito trans, onde no Fe1, o alcoxo está trans ao N_{amínico} (distância mais curta) e na ligação com o Fe2, o alcoxo está trans ao grupo H₂O (distância maior). O ângulo formado pela ligação Fe1-O2-Fe1A é de 101,95(8)°, apresentando-se no limite inferior do observado em outros complexos binucleares de Fe^{III} (101,1 – 110,7°). As pontes alcoxo formam um anel plano com os átomos de Fe^{III}, sendo a soma dos ângulos internos do anel formado igual a 360°, uma vez que o dímero se encontra sobre um centro de inversão cristalográfico. A distância entre os átomos de Fe é de 3,122(1) Å, sendo semelhante a outras encontradas na literatura.

A estrutura de raios-X de **(2)** também revelou a presença de quatro moléculas de H₂O como solvente de cristalização.

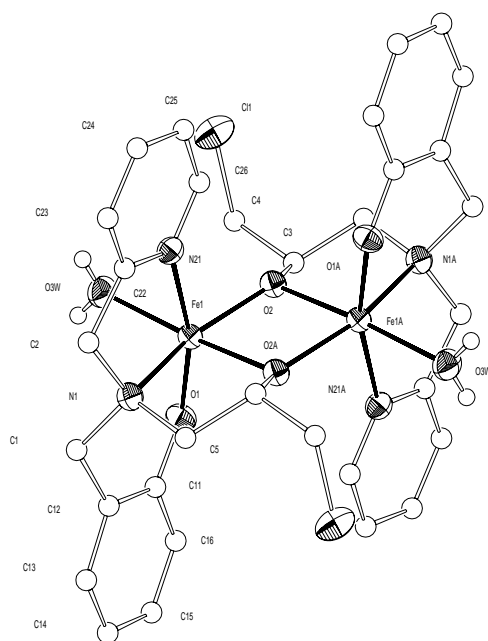


Fig. 5.13. Estrutura de raios-X do cátion complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (**2**).

Apesar do complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ não apresentar atividade hidrolítica frente a ésteres de fosfato pelo fato das duas moléculas de água estarem coordenadas de forma *anti*, o complexo (2) é capaz de promover a clivagem do DNA.

Conforme pode ser observado na Fig. 5.14, com o aumento da concentração do complexo (1) de 0 à 375 μM verifica-se a transformação da forma superenovelada (I) para forma circular (II) e desta para a forma linear (III). O experimento foi realizado utilizando-se DNA plasmídico. A Fig. 5.15, mostra um tratamento quantitativo para o processo de clivagem.

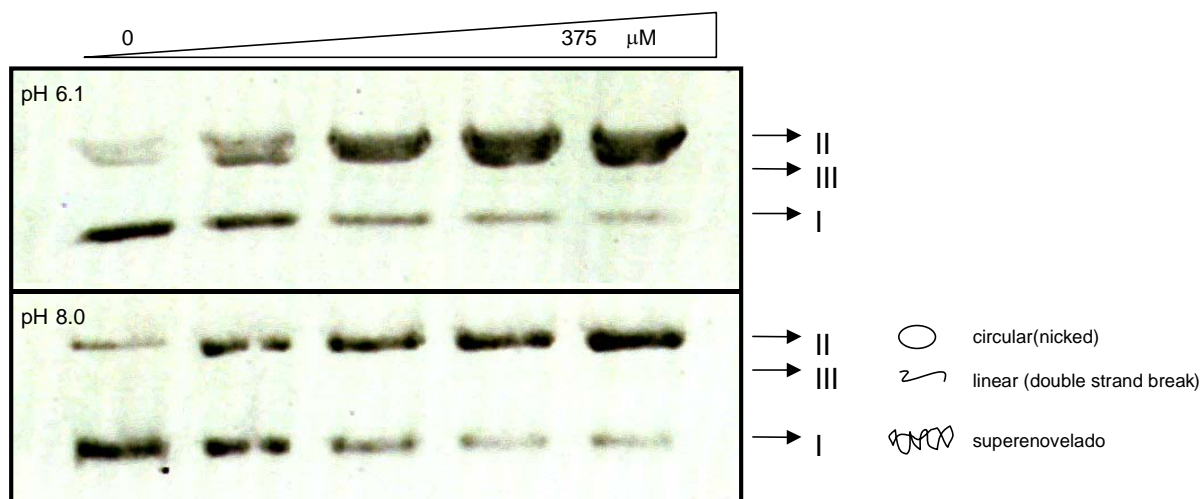


Fig. 5.14. Eletroforese do experimento de clivagem do DNA (plasmídico) promovido pelo complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (2) em pH 6,1 e 8,0.

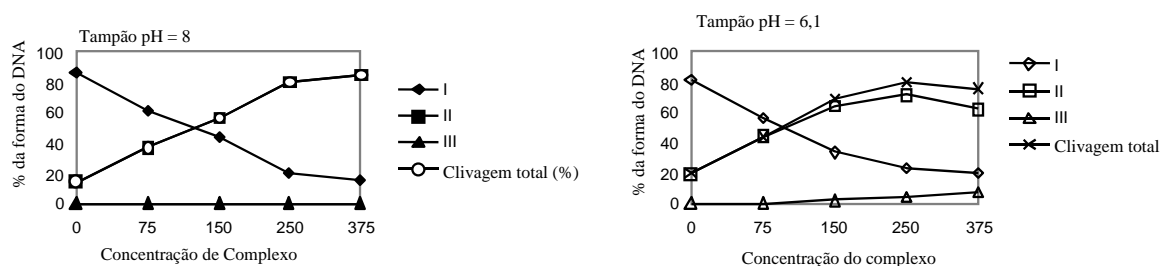


Fig. 5.15. Gráficos da variação da degradação do DNA com a concentração do complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (1). Os dados são referentes a Fig. 5.14.

O complexo (2) apresentou atividade hidrolítica similar nas duas condições de pH estudadas.

A Fig. 5.16 mostra a ação do complexo (2) sobre o DNA genômico em pH = 8.

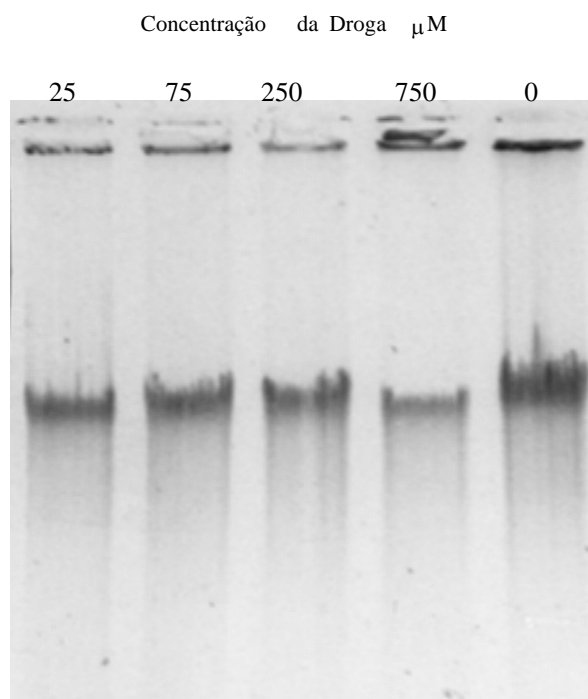


Fig. 5.16. Eletroforese mostrando a degradação do DNA genômico promovido pelo complexo (1).

Estudos revelam que metais podem promover a clivagem do DNA por dois mecanismos: hidrolítico ou radicalar. No caso da presença de átomos de ferro, sabe-se que a espécie Fe^{II} pode dar origem a radicais livres através da reação de Fenton. Como o complexo (2) apresenta um potencial redox (-0,408 V vs Fc/Fc^+) que possibilita que o mesmo seja facilmente reduzido, uma possibilidade levantada é que o complexo estivesse sendo reduzido na presença do DNA, formando a espécie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$, a qual poderia dar origem a radicais livres, que por sua vez promoveriam a clivagem do DNA. Para verificar esta hipótese repetiu-se o mesmo experimento, agora na presença de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, o qual é um forte agente oxidante e evita a formação de Fe^{II} . Deste modo, se fosse observado a inibição da clivagem do DNA, poder-se-ia inferir que o processo de clivagem estaria se dando via um mecanismo radicalar, pois a ausência de Fe^{II} não propiciaria a formação de radicais livres e portanto não se deveria verificar nenhum processo de clivagem do DNA. Contudo, ocorreu a clivagem mesmo na presença de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Isto nos leva a propor que o mecanismo de clivagem do DNA pelo complexo (1) esteja se dando por um mecanismo hidrolítico.

Pelo que se tem conhecimento até o momento, o complexo (2) é o primeiro exemplo de composto que não apresenta atividade hidrolítica frente a ésteres de fosfato simples mas que é ativo na clivagem do DNA. Sugere-se como provável mecanismo de hidrólise que moléculas de OH^-

coordenadas ao centro de Fe^{II} , geradas pelas condições de pH *in situ*, promovam o ataque nucleofílico diretamente no átomo de fósforo, não ocorrendo portanto, o mecanismo geralmente proposto para a hidrólise de ésteres de fosfato, onde o fosfato inicialmente coordena-se ao átomo metálico através da substituição de uma molécula de H_2O coordenada ao ferro e depois sofre um ataque nucleofílico por um OH^- coordenada a um segundo átomo metálico.

Desta forma, o complexo (2) pode ser considerado como uma metalohidrolase artificial em potencial.

5.4 Atividades de Auto-Avaliação

- 1) Com base no sítio ativo das diversas PAPs, explique porque as mesmas são cataliticamente ativas apenas em meio ácido (faixa ideal de pH 4,9-6,5).
- 2) Aparentemente a PAP $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ parece estar envolvida na degradação de eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue). Sugira uma forma razoável para que tal fenômeno venha a ocorrer (sugestão: levar em conta o sítio ativo da enzima e do DNA).
- 3) Quando oxidamos a forma $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ da fosfatase ácida púrpura para a forma $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ observa-se: a) A absorção máxima no espectro visível é deslocada de 505 para 550 nm mas o coeficiente molar de extinção (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) é mantido em $2000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ por centro de ferro. Explique. b) O espectro de EPR da espécie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ o qual é rômbo a 2 K com $g_1 = 1,85$, $g_2 = 1,73$, $g_3 = 1,58$ torna-se inativo para a espécie oxidada sob as mesmas condições. Explique esse resultado com base nas medidas magnéticas. c) O espectro da espécie oxidada apresenta dois dubletos [δ (ΔE_q : 0,55 (1,65) e 0,46 (2,12) mm/s], apesar de termos 2 centros de Fe^{III} . Esclareça esses resultados considerando os ambientes de coordenação em torno dos dois átomos de ferro.
- 4) Recentemente um grupo de pesquisas alemão observou que a forma oxidada $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ da PAP apresenta atividade catalítica em torno de 5% em relação a espécie reduzida, na hidrólise de ésteres de fosfato. Através da estrutura para a forma oxidada $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$, justifique essa observação.

- 5) Complexos binucleares de metais de transição normalmente possuem uma maior atividade catalítica em processos hidrolíticos incluindo ésteres de fosfato, DNA e RNA quando comparados com complexos mononucleares. Dê uma explicação para essa observação. (Sugestão: utilizar as estruturas dos sítios ativos).

- 6) Grupamentos fósforotiolato (enxofre) tem sido incorporados nos oligonucleotídeos (por ex. S no lugar de O no ATP). Discuta as potenciais ramificações dessas substituições para o mecanismo das nucleases e outras enzimas que processam ésteres de fosfato.

Capítulo 6

Transferrinas e Metais na medicina

Objetivos

- *Reconhecer as estruturas das transferrinas combinadas com os metais ferr, vanádio e outros e as suas propriedades espectroscópicas*
- *Conhecer os radiofármacos comercialmente disponíveis e utilizados em medicina nuclear*
- *Identificar as propriedades físico-químicas que fazem com que um complexo inorgânico possa ser utilizado como um radiofármaco*
- *Do ponto de vista químico, avaliar a atividade anti-tumoral do cis-platina*

6.1 As Transferrinas e os Modelos sintéticos

Transferrina é a denominação genérica de uma classe de proteínas não-heme relacionadas com o transporte e a regulação dos níveis de ferro em vertebrados. Os vários tipos de transferrinas encontradas em vertebrados são: soroalbumina (plasma sanguíneo), lactoferrina (leite, fluídos de secreção e leucócitos), ovotransferrina ou conalbumina (clara do ovo) e melanotransferrina (melanomas). Todas as transferrinas, com possível exceção da melanotransferrina, capturam e solubilizam o ferro controlando os níveis disponíveis do metal.

Através de estudos cristalográficos realizados com a soroalbumina, conalbumina e lactoferrina pode-se observar que todas as transferrinas são estruturalmente muito semelhantes. Recentemente a estrutura tridimensional da lactoferrina humana a 2,2 Å foi publicada (Fig. 6.1), confirmando um ambiente de coordenação formado por dois resíduos tirosinato, uma histidina, um aspartato e dois átomos de oxigênio do ânion carbonato, ligado de forma bidentada.

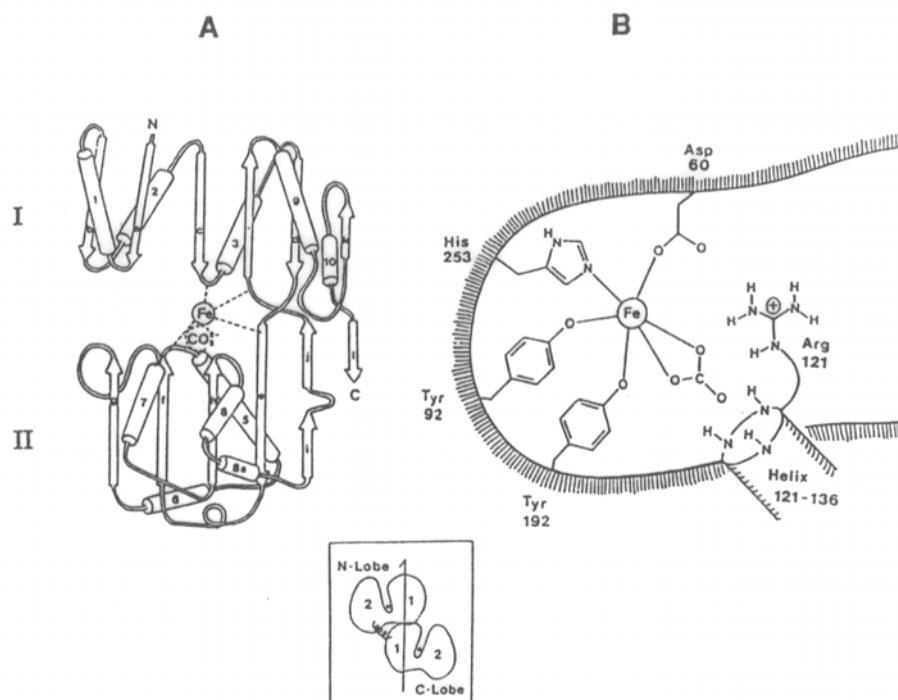


Fig. 6.1. a) Representação esquemática do sítio ativo da lactoferrina humana para o lobo N-terminal. b) Representação da cadeia polipeptídica para o lobo N-terminal.

Além do ferro, as transferrinas podem coordenar-se a muitos outros íons metálicos, como Fe, Mn, Cr, Co, V, alguns dos quais sugere-se que apresentem funções fisiológicas. O metabolismo do vanádio, tanto em dietas muito pobres quanto em níveis altamente tóxicos, implica na formação de transferrinas de vanádio. Estudos com determinados complexos do tipo peroxovanadatos tem demonstrado atividade anti-tumoral em certas formas de leucemia. Sugere-se que um processo redox no qual são formados V^{IV} e O_2^- seja responsável por essa atividade. A administração de sulfato de vanadilo na dieta de ratos também mostrou-se capaz de inibir carcinomas mamários induzidos quimicamente, além de que o íon VO^{2+} apresenta menor toxicidade que o V^V . Propõe-se que a liberação do grupo VO^{2+} para o tecido neoplásico, o qual é particularmente um rico receptor de transferrinas, represente a primeira etapa na inibição de carcinomas pelo vanádio.

Embora a estrutura da transferrina de ferro já tenha sido elucidada, ainda não se conhece inteiramente o ambiente de coordenação do vanádio nas vanádio-transferrinas. Entretanto, assim como nas transferrinas de ferro, são necessários dois átomos de vanádio para ocupar os sítios de coordenação C e N terminais da apo-transferrina humana. Os dois sítios C e N terminais, não completamente equivalentes da apo-transferrina humana podem ser distinguidos utilizando-se técnicas de ^{51}V NMR (para V^V) e EPR (para V^{IV}).

O espectro de EPR da $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$ (coordenação N-terminal) corresponde a um espectro de vanádilo (VO^{2+}) com geometria octaédrica e consistente com a estrutura proposta na figura 2. A presença de resíduos tirosinato na esfera de coordenação foi confirmada através de espectros UV-diferença, onde dois máximos distintos foram observados, um em 245 nm e outro em 295 nm, consistentes com a perturbação das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis fenólicos, correspondente à desprotonação dos resíduos tirosinato ligados ao metal.

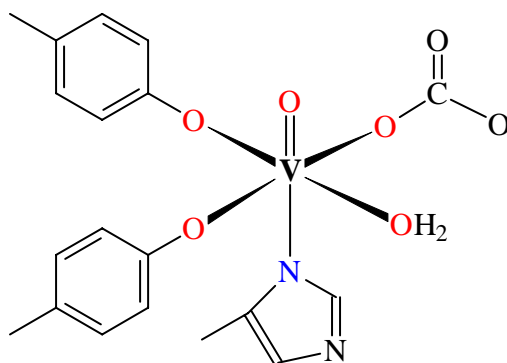


Fig. 6.2. Estrutura proposta para a $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$.

A $[V^{III}(\text{transferrina})]$ pode ser obtida através da reação da apo-transferrina com tricloreto de vanádio (III) (VCl_3), ou pela redução da $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$ com ditionito de sódio. Neste composto, observa-se a presença de uma banda de transferência de carga em 380 nm, comprovando a presença dos resíduos tirosinato coordenados ao vanádio.

Um fato importante a ser mencionado é que o íon VO^{2+} quando coordenado à apo-ovotransferrina, não requer o ânion sinérgico carbonato, enquanto que na vanádio sorotransferrina, o ânion CO_3^{2-} é indispensável. Portanto, a presença do íon sinérgico nas transferrinas de vanádio deve ser cuidadosamente avaliada.

Buscando uma melhor compreensão a respeito do sítio de coordenação das transferrinas de vanádio, tem-se utilizado o estudo de compostos modelo de baixo peso molecular com ligantes contendo átomos de oxigênio e nitrogênio doadores, cujas propriedades espectroscópicas sejam comparáveis às apresentadas pelas transferrinas de vanádio.

Todos os complexos de vanádio(III), vanádio(IV) não oxo, vanádio(V) não oxo, e vanádio(V) oxo descritos na literatura, em que o vanádio encontra-se ligado a grupos fenolato ou catecolato, apresentam intensas bandas de transferência de carga do tipo ligante \rightarrow metal. A ausência destas

bandas nas transferrinas de vanádio(IV) e (V) indica que o vanádio encontra-se na forma de VO^{2+} e VO^{3+} , respectivamente.

Apesar do grande número de complexos de vanádio (VO^{2+}) com ligantes contendo átomos de oxigênio e nitrogênio doadores descritos na literatura, nenhuma destas espécies exibe as propriedades espectrais (UV-Vis e EPR) observadas na $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$. Entretanto, o complexo $[OV^{IV}(\text{BBPEN})]$ (Fig. 6.3) possui propriedades espectroscópicas (UV-Vis e EPR) bastante semelhantes as $[OV^{IV}(\text{transferrinas})]$, representando o melhor modelo sintético para essa proteína (Tab.1)

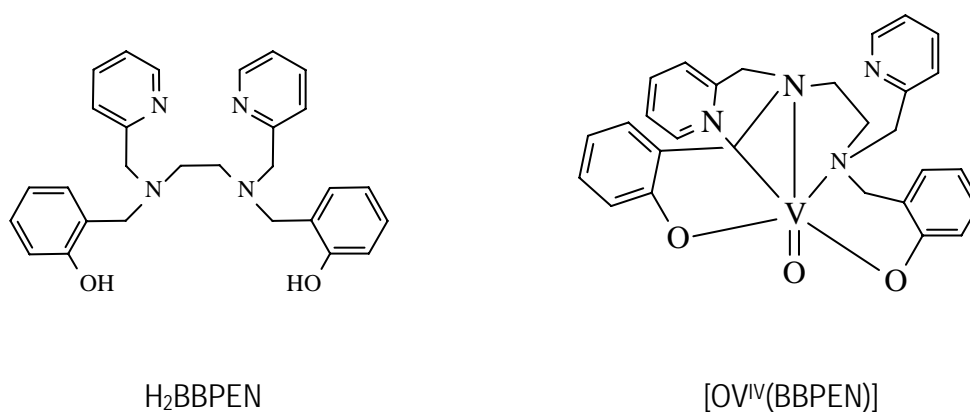


Fig. 6.3. Complexo modelo para a $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$.

Tab. 6.1. Dados espectrais UV-Vis para o modelo $[OV^{IV}(BBPEN)]$ e $[OV^{IV}(\text{transferrina})]$.

Complexo	$\lambda_{\text{max, nm}} (\epsilon, M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	transição
$[OV^{IV}(BBPEN)]$	925 (75), 870 (70) 555 (125) 405 (940)	$d_{xy} \rightarrow d_{yz}$ e $d_{xy} \rightarrow d_{xz}$ $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ $\pi_{\text{fenolato}} \rightarrow V^{IV}$
$[OV^{IV}(\text{tf})]$	926 (25), 800 (15) 592 (25)	$d_{xy} \rightarrow d_{yz}$ e $d_{xy} \rightarrow d_{xz}$ $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$

Para a $[V^{III}(\text{transferrina})]$, poucos complexos tem sido descritos na literatura como modelos. Alguns autores argumentam que a coordenação de grupos fenolato não estabilizaria o complexo de V(III) em relação a oxidação pelo ar. Entretanto, a $[V^{III}(\text{transferrina})]$ é bastante estável sob as mesmas condições experimentais. Recentemente, Neves e colaboradores publicaram a estrutura cristalina do complexo $[V^{III}(BBPEN)]PF_6$, o qual apresenta propriedades espectrais bastante similares as

observadas na [V^{III}(transferrina)] além de ser estável a oxidação pelo ar, o que o elege como um bom modelo para a metaloproteína.

6.2 Metais na Medicina

6.2.a. Introdução

O uso de ferro e cobre na medicina data dos Gregos e Hebreus conforme pode ser constatado pelos seus escritos. Entre outros metais comumente utilizados durante séculos, está o Hg²⁺ para o tratamento da sífilis, Mg²⁺ para doenças intestinais e Fe²⁺ para anemia. Certamente, que esses exemplos são extremamente rudimentares quando comparados às drogas sofisticadas como por ex. as sulfas introduzidas pelos químicos orgânicos no século passado. Porém, hoje, a química inorgânica começa a ter um impacto maior na medicina moderna. Três fármacos inorgânicos extremamente importantes são apresentados na Fig. 6.4. Uma dessas drogas é o cis-platina (cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]), um anticancer o qual é administrado de forma intravenosa para o tratamento de tumores testicular, dos ovários e cabeça. Quando diagnosticado no início, o cis-platina cura o câncer testicular em mais de 90% dos casos. O auranofin, [Au(PEt₃)(ttag)], onde ttag = tetra-O-acetilgliucose, é a primeira droga a qual pôde ser administrada oralmente, para o tratamento de artrite reumática. O terceiro exemplo é o [Tc(CNR)₆]⁺, no qual o tecnécio é utilizado como um rádio-isótopo ^{99m}Tc. Esta classe de complexos é seletivamente incorporada no tecido do miocárdio e tem se mostrado um excelente agente de imagem para o coração (rádio-marcador). Assim, três elementos não-essenciais encontraram excelentes aplicações na medicina.

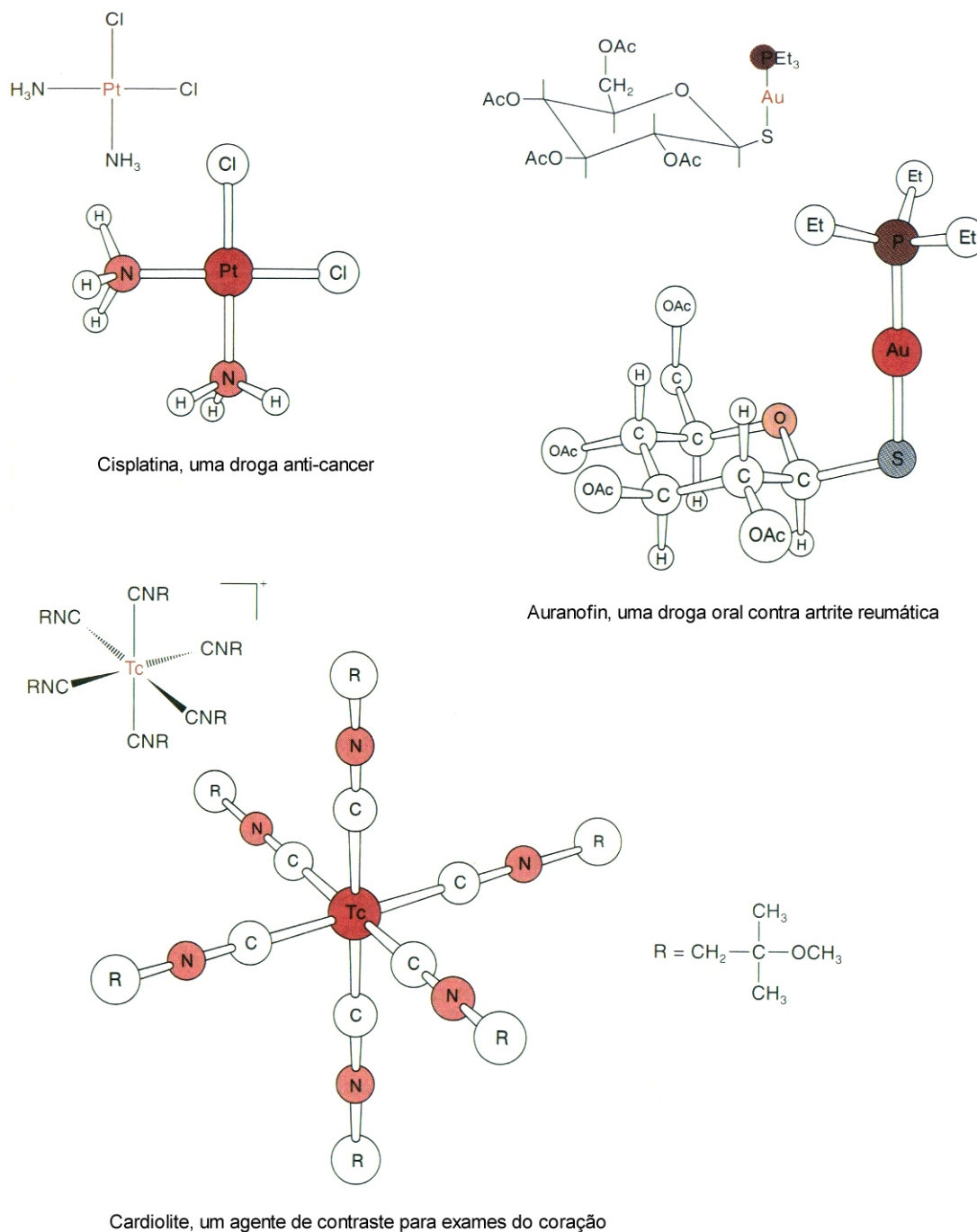
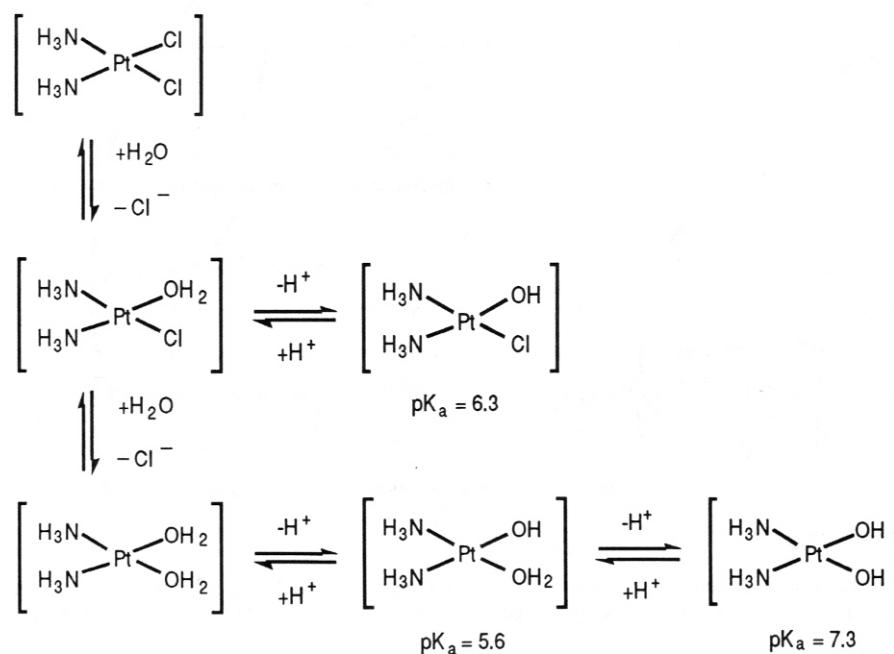


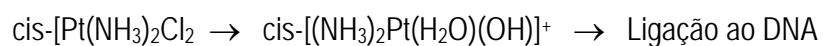
Fig. 6.4. Estruturas de três compostos inorgânicos utilizados na medicina moderna.

O estudo da química de moléculas-drogas sob condições provavelmente encontradas em tecidos vivos, é de extrema importância para o entendimento do mecanismo de ação em vivo. A partir do esquema 1, torna-se claro que a química aquosa do cis-platina pode ser extremamente complexa.



Esquema 1. Equilíbrios entre as diversas espécies do *cis*-Pt em meio aquoso.

Embora o *cis*-platina seja instável em relação a reações de hidrólise em meio aquoso, as elevadas concentrações de Cl⁻ extra-celular (~160 mM) inibem essas reações. No entanto, os baixos níveis de Cl⁻ intra-celular promovem a hidrólise rápida e assim o complexo aquo deve ser a espécie reativa que se liga ao DNA conforme reação abaixo.



A química em solução da interação do *cis*-Pt pode ser completamente acompanhada por ¹⁹⁵Pt NMR conforme mostrado na Fig. 6.5.

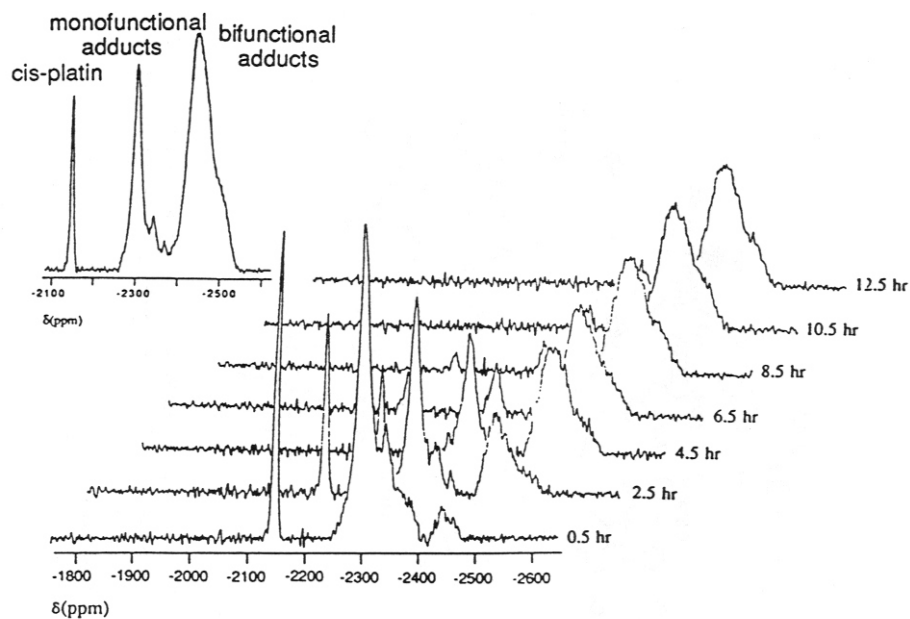


Fig. 6.5. Espectros de ^{195}Pt NMR monitorando a velocidade da reação do cis-Pt com o DNA dupla-fita.

Os dois isômeros cis e trans podem se ligar ao DNA com a mesma facilidade. No entanto, as conseqüências estruturais são completamente diferentes conforme pode ser visualizado na Fig. 6.6.

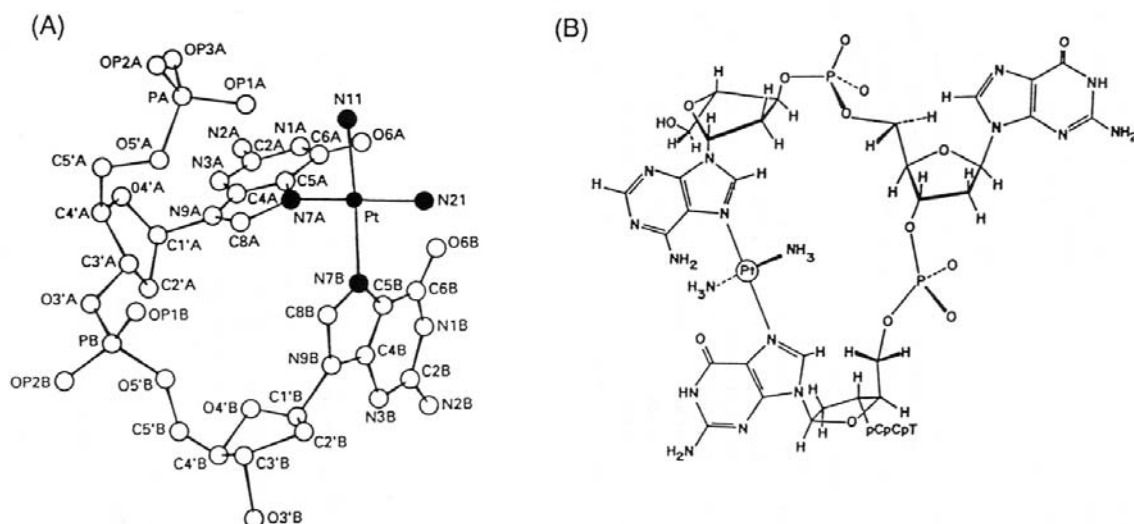


Fig. 6.6. Produtos formados pela reação (A) cis-Pt e d(pGpG) e (B) trans-Pt e d(ApGpGpCpCPT).

O cis-platina forma ligações 1,2-intra-fitas através da coordenação ao N-7 de duas bases guaninas adjacentes enquanto que o isômero trans forma adutos do tipo 1,3 e 1,4. A ligação do cis-platina resulta numa torção de 40° da dupla fita e uma dobra de 13° em relação ao sítio de ligação na Pt para os adutos cis-GG e cis-AG (Fig. 6.7). Evidências experimentais para esses ângulos podem ser obtidas a partir de estudos de eletroforese em gel. Tanto o grau de torção quanto o grau de dobra são necessários para o reconhecimento do DNA ligado a Pt por uma proteína de reconhecimento de danos, em células humanas. O mecanismo preciso da atividade do cis-platina como droga anti-cancer ainda é incerto; no entanto, diversas possibilidades tem sido identificadas as quais incluem bloqueamento da replicação do DNA ou ligação de proteínas de reconhecimento de danos que podem inibir interações com outros componentes presentes na célula.

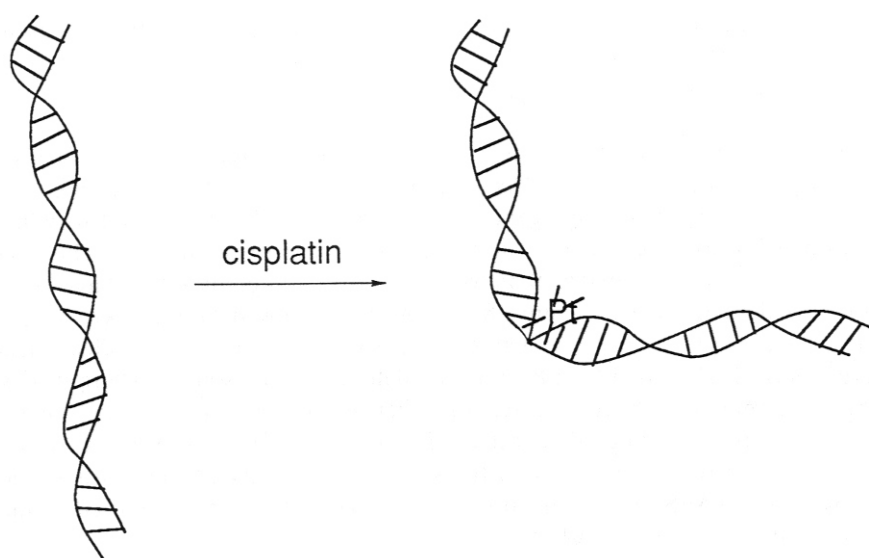


Fig. 6.7. Influência do cis-Pt ligado ao DNA dupla-fita.

6.2.b. *Rádiofármacos de Gálio e Índio*

A síntese de complexos cineticamente inertes e/ou termodinamicamente estáveis com os íons Ga(III) e In(III), envolvendo a utilização de ligantes multidentados que estabilizem estes íons em condições fisiológicas, representa uma área de pesquisa de grande relevância na atualidade. Tal fato está associado ao grande potencial de aplicação dos complexos de ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In e $^{113\text{m}}\text{In}$ como radiofármacos.

Os radiofármacos são medicamentos que possuem um radionuclídeo na sua composição com ampla utilização na medicina nuclear. Estes devem possuir algumas características que são peculiares a essa classe de compostos, particularmente com relação ao período de meia-vida e ao seu comportamento nos sistemas biológicos, para serem empregados no contexto medicinal. O conceito de período ou meia-vida efetiva resulta da agregação do tempo de meia-vida físico e do período biológico. O período biológico está relacionado com a possibilidade do radioisótopo ser excretado pelo organismo. Assim, o período efetivo representa a probabilidade do desaparecimento efetivo do radiofármaco, seja por eliminação ou por desintegração. Com relação ao comportamento nos sistemas biológicos, de uma maneira genérica os radiofármacos podem ser divididos em dois grandes grupos: a) aqueles em que a sua distribuição biológica deve-se estritamente ao fluxo sanguíneo; b) aqueles que possuem especificidade por algum órgão, tecido ou processo biológico.

O conjunto das propriedades dos radiofármacos, em sua grande maioria complexos metálicos, resulta do somatório das propriedades dos radionuclídeos, das propriedades físico-químicas dos complexos e da sua biodistribuição. Dependendo da técnica e do sistema de detecção a serem utilizados, os radionuclídeos devem ser emissores de radiação γ ou β .

Vários radionuclídeos que apresentam propriedades nucleares adequadas para sua utilização na radiofarmacologia estão disponíveis. Dentre todos eles, sem dúvida, o ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais utilizado nos procedimentos de diagnóstico na medicina nuclear. Particularmente, os elementos Ga e In possuem isótopos que são apropriados para a sua utilização em medicina nuclear. O isótopo ^{67}Ga ($t_{1/2} \approx 78$ horas / energia da radiação = 93, 184, 296 keV) e os isótopos ^{111}In e ^{113m}In são emissores de radiação γ ($t_{1/2} \approx 67,5$ horas e 1,67 hora / energia de radiação de 172,5, 247 keV e 393 keV, respectivamente), indicados para a utilização em exames cintográficos para diagnóstico. Já o isótopo ^{68}Ga é um emissor β^+ com meia-vida de 1,1 hora e energia de radiação de 511 keV, sendo utilizado em medicina nuclear para procedimentos envolvendo tomografia por emissão de pósitrons.

Quanto às propriedades físico-químicas, é fundamental que o radiofármaco não sofra nenhuma modificação na sua estrutura quando introduzido no meio fisiológico. Este meio compreende uma série de substâncias, por exemplo proteínas, açúcares e peptídeos, que são ricas na disponibilidade de elétrons e agem como potenciais ligantes aos centros metálicos. Pode-se destacar aqui a grande afinidade da transferrina por íons trivalentes como Fe^{3+} , Y^{3+} , Tc^{3+} , Ga^{3+} e In^{3+} e da albumina pelo íon Cu^{2+} . Também devem ser consideradas as condições de temperatura e pH com relação aos processos de hidrólise que podem ocorrer quando o radiofármaco for introduzido no organismo vivo e podem desintegrar a estrutura original do radiofármaco. Assim, é necessário que o

radiofármaco seja cinética e termodinamicamente estável para que sejam mantidas no ambiente fisiológico todas as propriedades para as quais foi desenvolvido.

A biodistribuição do radiofármaco deve ser seletiva para um determinado tipo de tecido vivo, ou seja, que apresente uma maior relação entre a quantidade acumulada no tecido vivo e a que fica distribuída nas vizinhanças deste. Uma vez que o centro metálico está protegido e não deve interagir com o meio biológico, a biodistribuição do radiofármaco depende exclusivamente das características do ligante e da forma como este interage com os tecidos vivos.

Os radiofármacos têm grande aplicação como agentes de diagnóstico e propiciam um diagnóstico precoce de muitas doenças, o que é fundamental para o sucesso do tratamento. Neste sentido, esses agentes têm se mostrado eficientes no diagnóstico precoce de doenças no aparelho digestivo, processos infecciosos, rejeição de órgãos transplantados e de processos tumorais. Recentemente também tem sido investigada a potencialidade dos radiofármacos como agentes terapêuticos através da irradiação *in situ* de neoplasias.

Embora nos últimos anos muitos grupos de pesquisa tenham se dedicado ao desenvolvimento de novos radiofármacos, ainda são muito poucas as formulações aprovadas pela Agência Food and Drug Administration (FDA) para uso rotineiro na medicina nuclear. A produção de novos medicamentos é um processo complexo e demorado; entretanto o grande potencial de aplicação dos radiofármacos nos procedimentos médicos torna o desenvolvimento de novos princípios ativos uma área de pesquisa relevante e atrativa.

Os íons de Ga(III) e In(III) produzem reações ácidas em meio aquoso pela formação dos respectivos hidróxidos através de hidrólise e apresentam uma grande afinidade com a transferrina no plasma sanguíneo. Assim, para que os compostos de Ga(III) e In(III) possam ser utilizados como radiofármacos, é absolutamente necessário que sejam termodinamicamente estáveis com respeito aos processos de hidrólise em pH fisiológico. Além disso, esses complexos metálicos também precisam ser cineticamente estáveis em relação a desmetalacão por parte da transferrina do soro sanguíneo. Os íons Ga(III) e In(III) por exemplo, apresentam constantes de estabilidade relativamente altas com a transferrina (Ga³⁺, logK₁ = 19,75, logK₂ = 18,80; In³⁺, logK₁ = 18,30, logK₂ = 16,44). Esse fato, associado à concentração de apotransferrina no sangue humano (aproximadamente 5 x 10⁻⁵ Mol.L⁻¹) a torna um potente ligante para estes centros metálicos.

O citrato de gálio-67, [67Ga(citrato)₂]³⁻, representado na Fig. 6.8. A, é um radiofármaco aprovado para diagnóstico de alguns tipos de tumores, processos infecciosos e inflamatórios. Este radiofármaco possui uma baixa constante de estabilidade e quando introduzido na corrente sanguínea o Ga(III) é imediatamente seqüestrado pela transferrina. Nesse caso, o radiofármaco efetivo é o complexo resultante da coordenação da transferrina ao metal. Porém o mecanismo que determina a

seletividade desse princípio ativo não está devidamente esclarecido. Uma teoria recente atribui a seletividade em virtude da presença de um sistema receptor de transferrina naqueles focos. No entanto, em testes com duas linhagens diferentes de células foi observado que tanto na ausência, quanto na presença do sistema receptor o composto ^{67}Ga -transferrina foi incorporado pelas células.

O composto $^{111}\text{In}(\text{oxiquinolina})_3$ (Fig. 6.7 B) também é um radiofármaco aprovado para diagnóstico de processos infecciosos ou inflamatórios e para a avaliação das vias do fluído cerebral. O $^{111}\text{In}(\text{oxiquinolina})_3$ é um composto de coordenação que atravessa a membrana dos glóbulos brancos, onde é retido pelos componentes do citoplasma. Os glóbulos brancos, que fazem parte do sistema imunológico, acumulam-se nos locais infectados ou inflamados e as células marcadas concentram o radionuclídeo nesses pontos permitindo que se faça o diagnóstico.

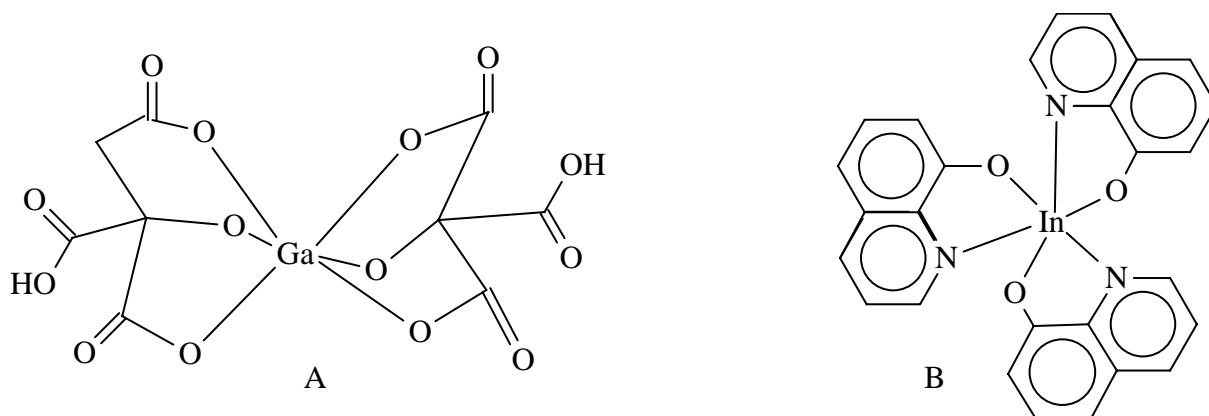


Fig. 6.8. Estruturas de dois complexos utilizados como radiofármacos: (A) $^{67}\text{Ga}(\text{citrato})_2^{3-}$ e (B) $^{111}\text{In}(\text{oxiquinolina})_3$.

6.3 Atividades de Auto-avaliação

- 1) transferrina quando ligada ao íon Fe^{III} possui uma coloração vermelho intensa com absorção máxima em 465 nm e absorvidade molar maior do que $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Baseado nos diversos tipos de transições eletrônicas, dê uma explicação para a origem deste espectro.
- 2) A transferrina de ferro do soro sanguíneo de ratos apresenta dois sítios de coordenação similares (mesmo ambiente de coordenação). No entanto, o seu espectro de EPR apresenta dois sinais com pequenas diferenças. Como podemos interpretar esse resultado?

- 3) Na metaloproteína [V^{III}(transferrina)] observa-se a presença de uma banda intensa em 380 nm a qual desaparece completamente após tratamento da proteína com oxidantes como [Fe(CN)₆]³⁻. Faça uma atribuição para essa banda na proteína no estado de oxidação V^{III}.
- 4) No caso da maioria das transferrinas (excessão – V-transferrina a partir do soro sanguíneo de coelhos e o íon VO²⁺) necessitam da presença do íon sinérgico CO₃²⁻ para a que o íon Fe³⁺ possa se coordenar a apo-transferrina. Esclareça o que vem a ser efeito sinérgico.
- 5) Por que complexos de Gálio e Índio possuem amplas aplicações na medicina nuclear?
- 6) Elementos não-naturais tais como Tc, Ga, In, Pt tem sido utilizados com sucesso na medicina. Quais as principais propriedades que esses elementos e seus complexos inorgânicos precisam apresentar?
- 7) O cis-platina é amplamente utilizado em diversos coquetéis, no tratamento de diversos tipos de câncer. Na sua opinião, a ciência já esclareceu todos os problemas químicos e bioquímicos relacionados a essa potente droga? A sua opinião certamente é pessoal mas deve estar suportada pelos conhecimentos existentes na literatura.
- 8) O citrato de gálio é um radiofármaco amplamente utilizado na medicina nuclear no diagnóstico de processos infecciosos e inflamatórios. Explique qual a razão que faz com que o íon Ga(III) seja imediatamente seqüestrado pela apo-transferrina quando presente na circulação sanguínea.
- 9) O que faz com que um determinado radiofármaco se concentre nos locais infectados ou inflamados permitindo assim o diagnóstico?

Capítulo 7

Metaloenzimas de Manganês

Objetivos

- Identificar os sítios ativos da catalase e superóxido dismutase de manganês
- Conhecer os mecanismos de ação da catalase e superóxido dismutase

7.1 Catalases

As catalases são enzimas responsáveis pela catálise da dismutação do peróxido de hidrogênio:



Vários artigos têm descrito níveis altos de H_2O_2 (geralmente $>50\mu\text{ mol.L}^{-1}$) como sendo citotóxicos para uma ampla faixa de células em cultura de animais, plantas e bactérias. Os valores de LD_{50} , bem como o modo de morte celular induzida (apoptose ou necrose) dependem do tipo de célula usada, seu estado fisiológico, tempo de exposição ao H_2O_2 , concentração de H_2O_2 usada e do meio de cultura de células empregado. Por isso, acredita-se que o peróxido de hidrogênio seja muito tóxico *in vivo* e deva ser rapidamente eliminado com o uso de enzimas de defesa como as catalases, peroxidases, etc.

Embora a maioria das catalases apresente centros heme, catalases de manganês de algumas bactérias têm sido caracterizadas. As enzimas mais estudadas vêm da *Thermus thermophilus* (*Tt*) e da *Lactobacillus plantarum* (*Lp*). Em ambos os casos, a enzima consiste de um hexâmero com subunidades equivalentes, cada uma com uma massa molecular de aproximadamente 35kDa. Uma estrutura de raios-X com resolução de 3Å da catalase de Mn *Tt* revelou que motivos em hélice constituem os principais elementos das estruturas secundária e terciária em cada subunidade.

O sítio ativo binuclear de manganês da catalase de *T thermophilus* situa-se numa cavidade rica em resíduos hidrofóbicos. A distância entre os átomos de manganês, Mn1-Mn2, é de 3,18Å na forma reduzida e de 3,14Å na forma oxidada. Os átomos de manganês estão ligados por dois ligantes-ponte exógenos, os quais foram modelados como sendo uma molécula de água e um átomo de oxigênio para a forma oxidada; para a forma reduzida, há um íon hidróxido e uma água. Esta última forma contém mais uma molécula de água coordenada a 2,0 Å de distância do centro de Mn1. Este centro também está coordenado por Glu36, Glu70 e His73. O íon Mn2 está coordenado por Glu155, His188 e Glu70.

Ambos os átomos de manganês estão coordenados numa geometria piramidal de base quadrada, como pode ser visto na Fig. 7.1.

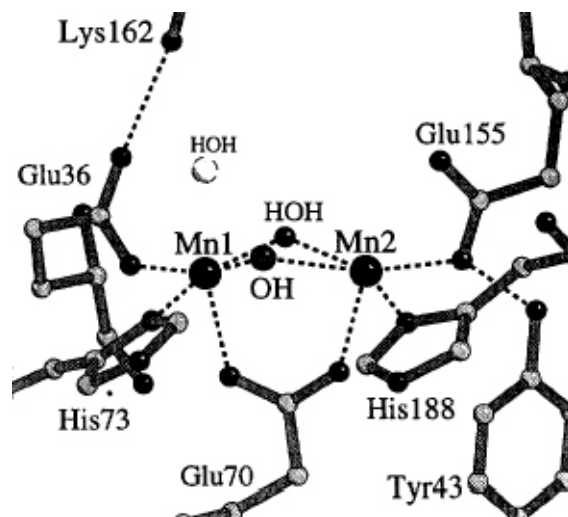


Fig. 7.1. Sítio ativo da forma reduzida da catalase de Mn da *T. thermophilus*.

Existem quatro estados de oxidação caracterizados para a catalase de Mn, simbolizados em termos dos estados de oxidação formal do Mn como (II,II), (II,III), (III,III) e (III,IV). Destes, apenas os estados (II,II) e (III,III) apresentam a capacidade de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio a altas taxas. A espectroscopia de RPE foi a primeira técnica a revelar que a catalase de Mn contém um centro binuclear de manganês e, além disso, tem sido exaustivamente aplicada para caracterizar a estrutura eletrônica de três dos quatro estados de oxidação conhecidos. A RPE revelou, por exemplo, que a catalase de Mn reduzida (II,II) contém um par de íons Mn(II) antiferromagneticamente acoplados. Dois sinais do estado excitado (estados tripleto e quinteto) podem ser observados, acima do estado fundamental diamagnético, em ambas as enzimas *Tt* e *Lp*. Elas apresentam uma dependência com a temperatura que se ajusta bem com a expressão de Boltzmann prevista para um par de íons Mn(II) acoplados por intercâmbio isotrópico de spin de Heisenberg, $(-2JS_1 \cdot S_2)$. No caso da enzima *Tt* reduzida, a energia de troca de spin para o derivado fosfato é fraca ($-5,6\text{cm}^{-1}$), e estimativas qualitativas para derivados ligados com outros ânions indicam uma faixa de valores entre -5 e -15cm^{-1} (Tab. 7.1).

Tab. 7.1. Propriedades físico-químicas de catalases de Mn (II,II) de *Tt* e *Lp*.

Par Mn(II)-Mn(II)	r(Mn-Mn)(Å)	D ₂ (ZFS)(cm ⁻¹)	J(cm ⁻¹)	IC ₅₀ (mmol.L ⁻¹)
Mn (acetato), Tt	3,51	-0,071	Nd	23
Mn (cloreto), Tt	3,51	-0,071	Nd	0,20
Mn (fluoreto), Lp	3,4	-0,094	-5,2	Nd

O estado de oxidação (III,III) da catalase de Mn é a forma predominante da enzima sob condições aeróbicas de isolamento. Embora não apresente um sinal na RPE, exibe bandas de absorção características na região do visível e do ultra-violeta próximo (380nm, $\epsilon = 300 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 485nm(ombro) $\epsilon = 260 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 680nm $\epsilon = 70 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), atribuídas, com base em comparações com complexos binucleares μ -oxo- μ -carboxilato-dimangânês(III), a bandas de transferência de carga oxo \rightarrow Mn(III) e carboxilato(O) \rightarrow Mn(III) e transições fracas de campo ligante do Mn(III), respectivamente.

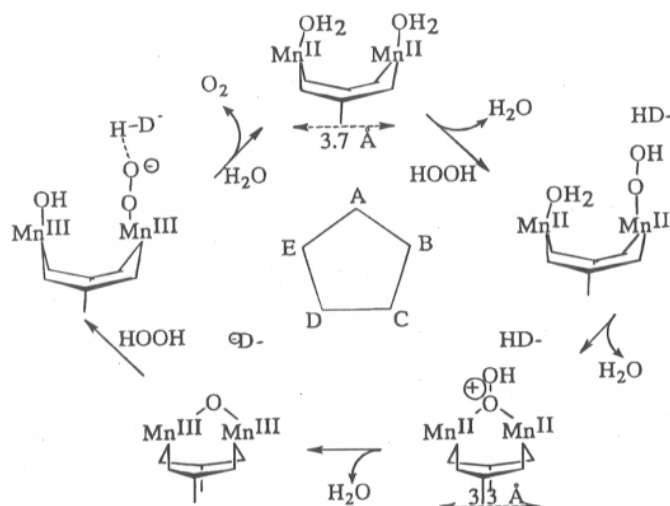
No que diz respeito a sua função, ambas as catalases, heme e de Mn, dismutam o peróxido de hidrogênio com taxas de reação altíssimas, próximas às observadas para reações controladas por difusão. A atividade fisiológica das catalases de Mn limita-se exclusivamente aos estados de oxidação (II,II) e (III,III), e acredita-se que um mecanismo cíclico do tipo "pingue-pongue" interconverta os dois estados de oxidação. Estudos de cinética em estado estacionário para a catalase *Tt* indicam uma etapa limitante da taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio que é de primeira ordem com relação à concentração da enzima e do peróxido, envolvendo o centro binuclear de manganês numa interconversão entre Mn₂(II,II) e Mn₂(III,III). Estudos com espectroscopia de absorção de raios-X indicam que estes também são os estados de oxidação das formas ativas da catalase de Mn isolada da *Lp*. Em ambos os casos, observa-se cinética de saturação com relação ao substrato, correspondendo a uma lei de taxa para a decomposição do peróxido de hidrogênio do tipo Michaelis-Menten para as três fontes conhecidas da enzima (Tab 7.2).

Tab. 7.2. Parâmetros cinéticos para a dismutação do H₂O₂ por catalases de manganês.

Proteína Mn ₂ (II,II)	k _{cat} (s ⁻¹)	K _M (mM)
<i>T. thermophilus</i>	2,6x10 ⁵	83
L. plantarum	2,0x10 ⁵	350
T. album	2,6x10 ⁴	15

As constantes de Michaelis (K_M) diferem em 20 vezes, enquanto que as eficiências catalíticas (k_{cat}/K_M) exibem variações entre espécies de apenas 5 vezes. Finalmente, na etapa determinante da taxa não são necessários prótons da solução na faixa de pH de 6 a 10; apesar disso, resíduos protéicos ionizáveis com pK_a 5,5 e 10,5 são catalisadores ácido/base internos essenciais na enzima *Tt*.

Com base nestes dados foi proposto um mecanismo a nível atômico para as catalases de Mn, como mostrado no esquema 1.

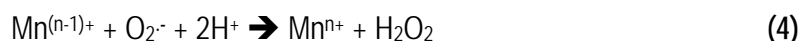


Esquema 1. Mecanismo proposto para a ação das catalases de manganês.

Na primeira etapa da reação ($A \rightarrow B$) o substrato liga-se diretamente a um sítio terminal no $Mn(II)$ com deslocamento de um ligante aquo. Isto é proposto com base nos estudos de ligação de ânions¹⁵, os quais sugerem que a troca do substrato ocorre inicialmente num sítio terminal (como observado nos estudos com cianeto). Acredita-se que um resíduo protéico interno funcione como acceptor de próton para a ionização do peróxido de hidrogênio e, posteriormente, como doador de próton para formar o produto água (este resíduo poderia ser a base com $pK_a \sim 5,5$ cataliticamente importante, como foi mencionado anteriormente). Acredita-se que a ativação do peróxido para redução ao nível de óxido ocorra numa etapa crítica na qual o substrato ligado (B) desloca-se para formar uma ponte $\mu-\eta_2$ -peróxido (C). Esta proposta de modo de ligação é baseada em estudos de coordenação de ânions, os quais demonstraram que ânions do tipo F^- , Cl^- , etc., substituem moléculas de água, ligando-se preferencialmente no sítio ponte.

7.2 Superóxido Dismutases (SOD)

Esta enzima é encontrada em uma série de organismos e com diversos metais em seu sítio ativo (Zn, Cu, Fe e Mn). A forma da SOD contendo manganês já foi isolada em mitocôndrias de galinhas e nas bactérias *Escherichia Coli* e *Thermus thermophilus*. Sua função é catalisar a decomposição de radicais superóxido, segundo as reações.



A desnaturação das formas contendo manganês, seguida da sua reconstituição com outros metais (Co(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II), Cu(II)) não restabelece a atividade da enzima. Por outro lado, a reconstituição da apoenzima com MnCl_2 reproduz sua atividade catalítica.

A SOD isolada da bactéria *Thermus thermophilus* apresenta estrutura cristalina resolvida por difração de raios-X (Fig. 7.2). Seu sítio ativo é constituído por um átomo de manganês (III), pentacoordenado, em geometria bipirâmide trigonal. Sua primeira esfera de coordenação é constituída por três átomos de nitrogênio provenientes de resíduos de histidina, um átomo de oxigênio de resíduo aspartato e um átomo de oxigênio proveniente de uma molécula de água ou de um íon hidróxido.

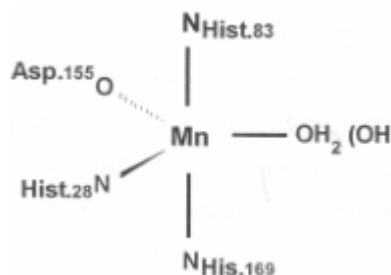


Fig. 7.2. Primeira esfera de coordenação do complexo de manganês presente no sítio ativo da superóxido dismutase de manganês da bactéria *Thermus thermophilus*.

7.3 Atividades de Auto-avaliação

- 1) Quais as razões que fazem com que o H_2O_2 seja muito tóxico em vivo?

-
- 2) Existem quatro estados de oxidação caracterizados para a catalase de Mn, simbolizados em termos dos estados de oxidação formal do Mn como sendo, (II,II), (II,III), (III,III), e (III,IV). Por que apenas os estados (II,II) e (III,III) são capazes de dismutar o peróxido de hidrogênio?
 - 3) O estado de oxidação (III,III) da catalase de Mn é a forma predominante da enzima sob condições de isolamento. Dê uma explicação razoável para o fato dessa espécie não apresentar nenhum sinal no espectro de EPR. (sugestão: utilize os resultados obtidos das medidas magnéticas).
 - 4) Uma análise dos dados cinéticos para três catalases oriundas de diferentes fontes (Tab. 7.2) revelam que as três metaloenzimas possuem atividades catalíticas similares (ver valores de k_{cat}). O que se pode concluir com relação ao mecanismo de ação dessas enzimas?
 - 5) Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são extremamente reativos e certamente são extremamente prejudiciais para todos os sistemas vivos. a) Explique, através de equações químicas, como uma SOD atua na eliminação desses radicais; b) Proponha um mecanismo para a dismutação de íons $O_2^{\cdot-}$ através da SOD derivada da *Thermus thermophilus* (Fig. 7.2). (Observação: O Mn^{II} possui uma coordenação pentacoordenada no seu sítio ativo).

Capítulo 8

Métodos Experimentais na Química Bioinorgânica

Objetivos

- *Conhecer os princípios básicos dos diversos métodos experimentais utilizados na química bioinorgânica e utiliza-los na identificação de metaloproteínas e complexos modelos*

8.1 Introdução

A investigação sobre o sítio ativo de metaloenzimas compõe um trabalho árduo e longo que pode ser enumerado em diversas etapas como:

1. isolamento e purificação da metaloenzima;
2. caracterização das propriedade físico-químicas da metaloenzima;
3. confirmação das propriedades por diferentes técnicas;
4. comparação das propriedades da metaloenzima com as de modelos sintéticos bem caracterizados;
5. proposta de sítio ativo;
6. proposta de atuação fisiológica da metaloenzima;
7. proposta de mecanismo de ação da metaloenzima.

Necessariamente, as etapas acima citadas não ocorrem na seqüência enumerada. Geralmente, especialistas de diferentes campos do conhecimento (biólogos, físicos, químicos, bioquímicos, etc) contribuem com etapas distintas e interagem entre si, de modo a obter o máximo de informações possíveis sobre uma determinada metaloenzima.

Com toda certeza, as técnicas espectroscópicas são de fundamental importância no que diz respeito as etapas 2, 3, 4 e 5 sobre a investigação do centro prostético de uma metaloenzima. Estas técnicas podem suprir informações como:

1. Qual átomo metálico compõe o sítio ativo das metaloenzimas;
2. que tipo de ligante compõe o ambiente de coordenação;
3. estado de oxidação dos átomos metálicos;
4. transições eletrônicas e nucleares presentes no sítio ativo;
5. movimentos vibracionais e rotacionais.

Estas informações podem ser obtidas pela investigação de uma ou mais regiões do espectro eletromagnético que é dividido conforme Fig. 8.1

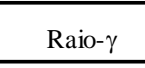
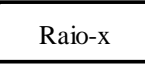
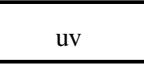
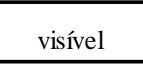
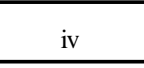
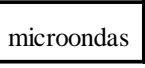
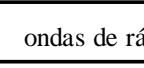
	transições nucleares	transições das camadas eletrônicas	transições eletrônicas da camada de valência	vibração molecular	rotação molecular	spin nuclear	
							
$\lambda(\text{nm})$	$10^{-12} - 10^{-10}$	$10^{-10} - 10^{-8}$	$10^{-8} - 10^{-6}$	$10^{-6} - 10^{-4}$	$10^{-4} - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^2$	
$\nu(\text{Hz})$	$10^{18} - 10^{20}$	$10^{16} - 10^{18}$	$10^{24} - 10^{26}$	$10^{22} - 10^{24}$	$10^{20} - 10^{22}$	$10^6 - 10^{10}$	
$E(\text{J})$	$10^9 - 10^{11}$	$10^7 - 10^8$	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$	$10^2 - 10^4$	$10^{-3} - 10^2$	

Fig. 8.1. Representação dos diversos tipos de radiação do espectro eletromagnético, o tipo de efeito que promovem e suas respectivas faixas de energia em unidades de comprimento de onda (λ), frequência (ν) e energia (E).

A soma de informações obtidas por diversas técnicas de investigação, aliado a um trabalho de comparação dos resultados com modelos sintéticos, vão gerando informações sobre o sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, a proposta de modelos para o complicado “quebra-cabeças” que é o sítio ativo de uma metaloenzima.

Estas propostas de sítio ativo, é o que leva os pesquisadores a sintetizarem modelos que possam apresentar propriedades semelhantes as da enzima estudada, culminando, as vezes, em modelos que apresentam inclusive propriedades de catálise (modelo funcional), o que ajuda a esclarecer o mecanismo de ação da enzima.

Um breve resumo das principais técnicas, fundamentos teóricos e de que tipo de informações elas forneceram sobre o sítio ativo das PAPS, será dado abaixo.

8.2 Espectroscopia eletrônica

A região do espectro eletromagnético que inclui a luz visível, o ultravioleta próximo e o infravermelho próximo, é a região do espectro que provém informações sobre transições eletrônicas presentes em moléculas.

Duas importantes informações são supridas por esta técnica:

1. a energia necessária para que a transição ocorra (comprimento de onda);
2. a facilidade (probabilidade) com que esta transição é realizada.

Através destas informações, pode-se obter dados sobre o tipo de ligantes coordenados ao átomo metálico e a geometria de coordenação do mesmo.

O princípio teórico da técnica é governada pela lei de Lambert-Beer (eq. 1) que é a medida da intensidade relativa de um raio antes (I^0) e depois (I) que o mesmo passa por uma solução contendo moléculas que absorvem energia:

$$A = \log(I^0/I) = \epsilon cl \quad (1)$$

onde c é a concentração molar da espécie estudada, l é o caminho ótico (cm) que o raio percorre através da amostra e ϵ é o coeficiente molar de extinção ($M^{-1}cm^{-1}$). Este é independente da concentração da espécie e reflete a facilidade com que a transição ocorre.

As transições eletrônicas podem ser classificadas em:

1. transferência de carga;
2. d-d
3. intervalência.

E estão representadas na Fig. 8.2.

As transferências de carga podem ser do tipo ligante-metal (TCLM), metal-ligante (TCML), e intraligante (TCIL). São caracterizadas principalmente pelo alto valor de ϵ ($\epsilon > 1000 M^{-1}cm^{-1}$).

As transições d-d são aquelas que ocorrem entre os orbitais d do metal. Geralmente apresentam valores de ϵ baixos ($\epsilon < 100 M^{-1}cm^{-1}$).

As transições de intervalência são aquelas que ocorrem em complexos polinucleares de valência mista, onde os estados de oxidação dos metais não podem ser localizados com precisão, ou seja, um determinado elétron fica migrando entre dois átomos metálicos (através de uma ponte). Quando o

elétron esta semi-deslocalizado, observam-se espectros com bandas que apresentam baixos valores de absorvidade molar. Já em espécies de valência mista com o elétron totalmente deslocalizado, pode-se observar bandas com elevados valores de absorvidade molar.

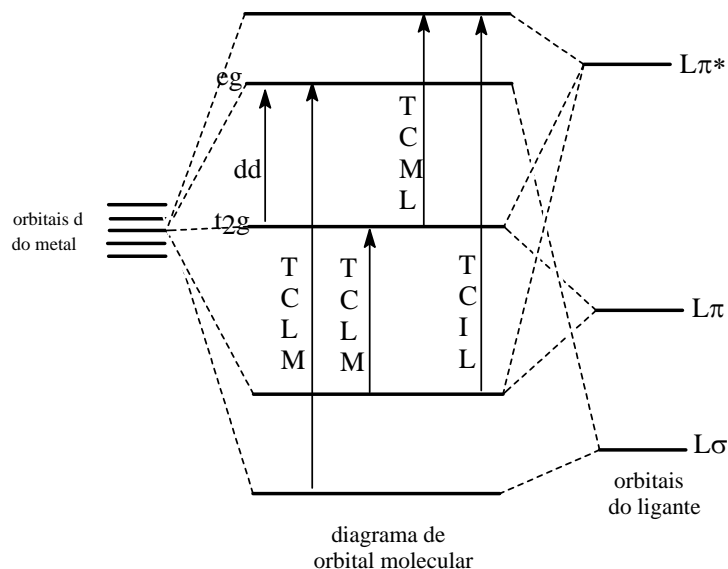


Fig. 8.2. Representação das transições eletrônicas comumente observadas em complexos metálicos.

O valor de ϵ é governado pelas chamadas regras de seleção. Devido a essas regras, é que se pode observar transições que apresentam elevados valores de ϵ e outras com baixos valores para ϵ . As transferências de cargas são bandas que apresentam transições permitidas (valores elevados de ϵ). Já as transições d-d são transições proibidas. A classificação de proibida ou permitida é governada pelas seguintes regras:

1. Regra da multiplicidade de spin: são proibidas as transições que implicam na mudança do número de elétrons desemparelhados. Exemplo: $t_{2g}^3 e_g^2 \rightarrow t_{2g}^2 e_g^3$;
2. regra de Laporte: são proibidas as transições que envolvem a redistribuição dos elétrons numa única camada quântica.

Desta forma, dependendo das restrições impostas pelas regras de seleção, o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) apresenta-se com os seguintes valores:

- a) $\epsilon = 10^2 - 1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - englobam transições proibidas por spin mas permitidas por Laporte.
 b) $\epsilon = 1 - 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – englobam transições permitidas por spin mas proibidas por Laporte.
 c) $\epsilon > 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – englobam transições permitidas por spin e por Laporte

A análise do espectro eletrônico da PAP (Fig. 8.3) revela:

1. Devido ao alto valor do coeficiente de absorvidade molar da banda localizada entre 550 e 570 nm na espécie Fe_2^{III} ($\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a transição é classificada como uma transferência de carga do tipo ligante→metal. O único ligante natural endógeno que pode fazer uma transferência de carga com átomos de Fe^{III} é a tirosina. Poder-se-ia também ter uma transferência de carga no caso da presença de uma ponte oxo exógena.
2. Quando reduzida para a espécie de valência mista ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$) a PAP tem seu máximo de absorvância deslocado para 505-510 nm. Contudo, o valor de ϵ não se altera. Isto indica que não há tirosina coordenada ao centro de ferro que foi reduzido, pois se houvesse, o valor de ϵ também decresceria, visto que não ocorre transferência de carga entre Fe^{II} e a tirosina. O mesmo seria verificado com a presença de uma possível ponte oxo.
3. Com base no elevado valor de ϵ , se propôs inicialmente a presença de duas ou mais tirosinas coordenadas, visto que através de modelos sintéticos, cada fenolato coordenado a um centro de Fe^{III} tem uma participação de até $2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ no valor de ϵ .²⁰ Como a PAP possui um $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, teria-se duas tirosinas coordenadas. Contudo, a obtenção de um modelo sintético que apresentou um $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ com apenas 1 fenolato coordenado, veio por em dúvida esta afirmação. As estruturas atualmente conhecidas confirmam a presença de apenas um fenolato.

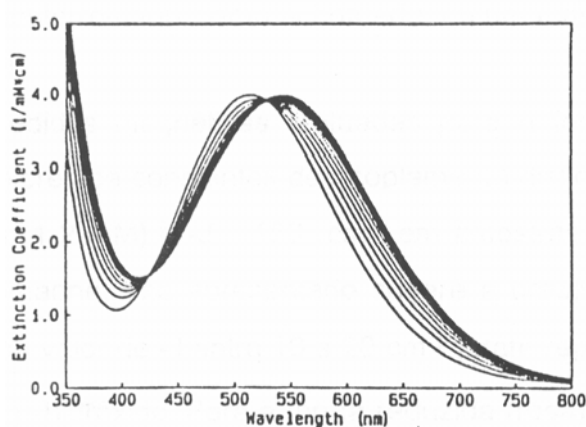


Fig. 8.3. Espectro eletrônico da ufPAP mostrando a interconversão da forma púrpura (2Fe^{3+} , 550 nm) na forma rosa ($\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}$, 505 nm).

Deste modo, através da análise do espectro eletrônico da PAP, pode-se chegar a seguinte proposta para o seu sítio ativo:

1. Presença de tirosina coordenada a apenas um dos centros de ferro;
2. Possibilidade de uma ou mais tirosinas coordenadas ao sítio de ferro responsável pelas propriedades do cromóforo.
3. Um dos átomos de ferro é passível de redução, o qual não deve possuir tirosina coordenada.
4. O átomo de ferro que permanece oxidado é o responsável pelas propriedades do espectro eletrônico, e possui tirosina coordenada.

8.3 Espectroscopia Raman

Visto de modo geral, a espectroscopia Raman poderia ser considerada uma simbiose entre a espectroscopia eletrônica e a espectroscopia de infravermelho (vibracional). Assim como na espectroscopia de infravermelho, a espectroscopia Raman fornece informações sobre movimentos vibracionais.

O espectro Raman é resultante do espalhamento inelástico da luz, ou seja, a frequência ou energia da radiação incidente, é diferente da energia da radiação final observada. Na espectroscopia Raman, a radiação (laser) incidente encontra-se na faixa do ultravioleta ou visível e a observada na região do infravermelho.

Neste tipo de técnica espectroscópica, incide-se um feixe discreto de radiação sobre a amostra a ser estudada. Dependendo da frequência da radiação incidente, a molécula pode absorver energia, passando para um estado eletrônico excitado, chamado estado virtual. Ao retornar ao estado fundamental, a molécula emite radiação. Se esta emissão for da mesma frequência da radiação incidente (espalhamento elástico), tem-se o chamado espalhamento Rayleigh. Contudo, se um certo modo vibracional da molécula é influenciado pela absorção da radiação incidente, ao voltar para o estado fundamental, a molécula poderá emitir radiação de maior ou menor energia que a radiação incidente. Se a molécula emitir radiação de menor energia que a incidente, observa-se as chamadas linhas de Stokes. Se a radiação emitida possuir energia maior que a incidente, observa-se as linhas anti-Stokes (Fig. 8.4).

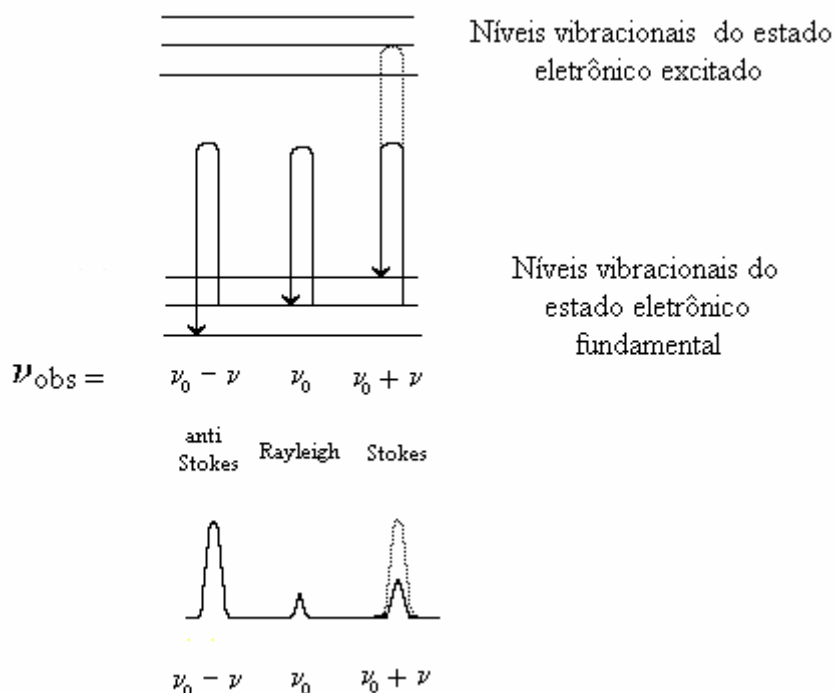


Fig. 8.4. Esquema ilustrativo mostrando como se forma as linhas anti-Stokes, Rayleigh e Stokes.

Refletindo a lei de distribuição de Boltzman, as linhas anti-Stokes são mais fracas que as Stokes. As linhas Rayleigh são as mais intensas, contudo não fornecem informações sobre níveis vibracionais, pois trata-se de um espalhamento elástico da radiação. Portanto, o resultado experimental observado surge das linhas de Stokes.

A probabilidade de um espalhamento inelástico da radiação ocorrer, aumenta quando a radiação incidente apresenta energia igual a energia necessária para que uma transição eletrônica ocorra. Experimentalmente utiliza-se uma radiação laser de energia semelhante ao máximo do comprimento de onda em que a espécie estudada apresenta uma transferência de carga. O resultado observado é um aumento da intensidade dos modos vibracionais do grupo responsável pela transferência de carga.

A investigação por espectroscopia Raman (Fig. 8.5) da PAP utilizando-se um laser de 514,5 nm, apresentou o seguinte resultado:

1. O espectro da forma inativa mostrou o aumento das vibrações do grupo tirosina (1597, 1497, 1281, 1164 cm^{-1}).

2. A manutenção das intensidades das bandas da tirosina na forma ativa da PAP ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$), confirma que não deve haver tirosina coordenado ao centro de ferro passível de redução.
3. Estudo de substituição isotópica com ^{18}O não evidenciou a presença de pontes oxo exógena unindo os átomos de ferro.

Desta forma, a espectroscopia Raman ajudou a confirmar as informações obtidas pela espectroscopia eletrônica, tais como:

1. Presença de tirosina coordenada ao centro de ferro(III), sendo esta a responsável pela transferência de carga tirosina $\rightarrow\text{Fe}^{3+}$.
2. Ausência de ponte oxo unindo os dois átomos de ferro.

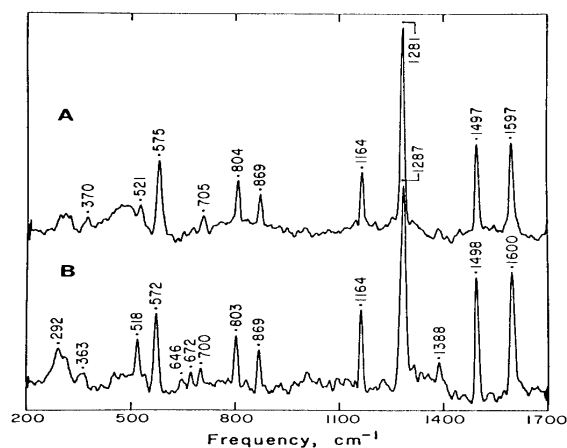


Fig. 8. 5. Espectro Raman ressonante da forma inativa (A) e ativa (B) da bsPAP.

8.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é uma poderosa ferramenta no estudo de espécies que possuem elétrons desemparelhados. É usada tanto no estudo de moléculas orgânicas (radicais) como no estudo de complexos metálicos. A técnica baseia-se na aplicação de um campo magnético sobre uma espécie que apresenta elétrons desemparelhados.

No caso mais simples, onde a molécula estudada possui apenas 1 elétron desemparelhado, sabe-se que este elétron apresenta um momento magnético de spin que pode ser $+1/2$ ou $-1/2$ (Fig.

8.6). Na ausência de um campo magnético, este momento magnético de spin encontra-se degenerado.

A aplicação de um campo magnético resulta na perda desta degenerescência, separando, desta forma, os níveis $m_s = -1/2$ e $m_s = +1/2$. A diferença energética entre os dois níveis é dada pela equação 2:

$$\Delta E = h\nu = g_e\beta_e H_0 \quad (2)$$

onde: ν = frequência da radiação eletromagnética;

β_e = magneton eletrônico de Bohr

h = constante de Planck

H_0 = valor do campo aplicado.

g_e = fator g do elétron.

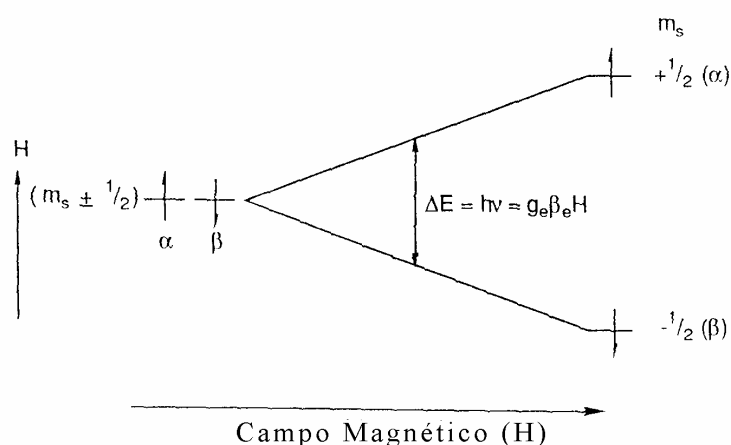


Fig. 8.6. Desdobramento do nível $S = 1/2$ ($m_s = \pm 1/2$) sob efeito de um campo magnético.

Desta forma, a técnica de EPR estuda a energia necessária para que ocorra a transição entre os momentos magnéticos de spin $m_s = -1/2$ e $m_s = +1/2$.

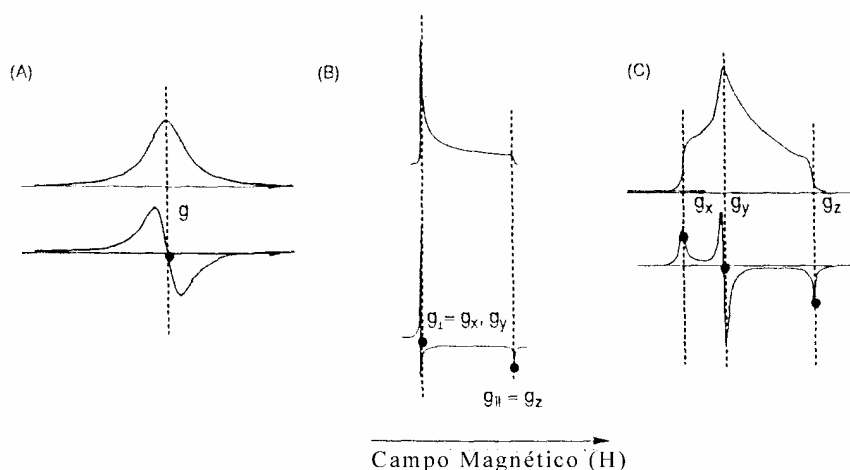


Fig. 8.7. Espectro de EPR (superior) e primeira derivada (inferior) do tipo (a) isotrópico, (b) axial, (c) rômboico.

O estudo de EPR de compostos contendo íons metálicos é um pouco mais complicada do que o de radicais orgânicos. Isto se deve ao fato dos elétrons desemparelhados se encontrarem nos orbitais d do metal, os quais podem possuir diferentes componentes nos eixos x, y e z. Dependendo da componente sobre estes eixos, pode-se observar espectros isotrópicos ($x = y = z$), axiais ($x = y \neq z$) e rômboicos ($x \neq y \neq z$) (Fig. 8.7).

Outro efeito que também pode ser verificado no caso dos metais, é o acoplamento spin-orbita. Isto se dá quando o momento magnético de spin acopla com o momento angular orbital, ou seja, o campo magnético gerado pelo movimento do elétron em torno do núcleo faz com que o momento magnético de spin perca a degenerescência (zero field splitting – desdobramento do campo zero). Um terceiro efeito é o do acoplamento do spin nuclear com o spin eletrônico, o que dá origem a interações denominadas de hiperfinas e superhiperfinas (Fig. 8.8).

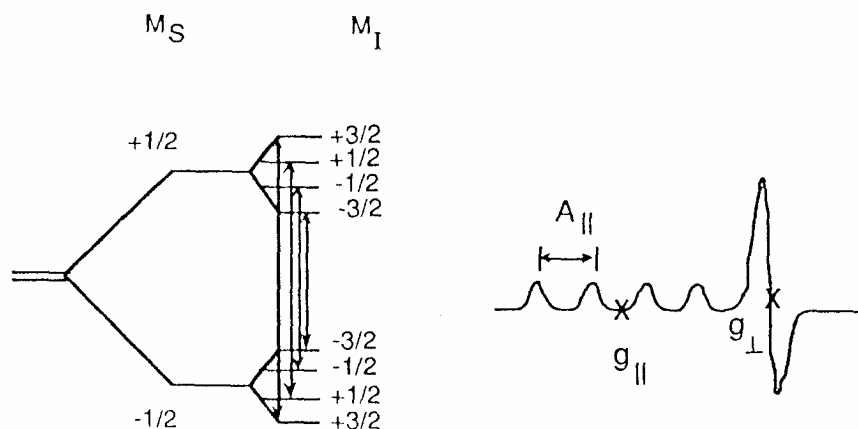


Fig. 8.8. Esquema mostrando o acoplamento do spin magnético do elétron com o spin nuclear para um complexo de Cu^{2+} (esquerda). O espectro de EPR (direita) mostra claramente a interação hiperfina resultante deste acoplamento através do surgimento de 4 linhas tanto na região do g_{\parallel} como no g_{\perp} .

Dois informações básicas são avaliadas do espectro de EPR:

1. Valores de g – representa a energia do estado de spin;
2. estrutura múltipla (A) – mostra a presença de possíveis interações com grupos vizinhos.

Os valores de g refletem o ambiente de coordenação do sítio metálico. Fazendo-se uma analogia com o NMR, g seria equivalente ao δ , sendo definido pela equação 3 :

$$g = h\nu/\beta_e H_0 \quad (3)$$

A estrutura múltipla (A), quando aparece no EPR, é equivalente a multiplicidade que é observada no NMR. Da mesma forma, reflete o acoplamento do centro paramagnético com os grupos vizinhos.

Dependendo da simetria local do sítio paramagnético, o espectro de EPR pode apresentar um único sinal (Fig. 8.7). Este tipo de espectro é chamado de espectro isotrópico, sendo observado quando o ambiente de coordenação em torno do sítio paramagnético é o mesmo sobre todos os eixos. Portanto, tem-se $g_x = g_y = g_z$. Já quando o ambiente de coordenação é o mesmo no plano equatorial, mas difere no eixo axial, tem-se um espectro com dois sinais, refletindo $g_x = g_y \neq g_z$. Quando se tem um

ambiente de coordenação totalmente inequivalente, observa-se um espectro rômboico, onde $g_x \neq g_y \neq g_z$.

Os espectros mais simples de serem estudados são daqueles íons metálicos que possuem apenas 1 elétron desemparelhado, como no caso do Cu^{2+} e V^{4+} . Contudo, isso não significa que outros íons, com mais de 1 elétron desemparelhado, não possam ser estudados. A regra básica é a presença de um sítio paramagnético.

O estudo do espectro de EPR das PAPs revelou (Fig. 8.9):

1. O sítio ativo das PAPs possui uma geometria rômboica, o que implica na coordenação de diferentes ligantes em torno dos átomos metálicos.
2. O espectro dependente do pH possibilitou a determinação de um $\text{pK}_a \approx 4,5$ atribuído a presença de uma molécula de H_2O coordenado ao sítio metálico.
3. Um espectro, a baixa temperatura, típico de espécies com apenas um elétron desemparelhado, revela a presença de acoplamento antiferromagnético, com $J = -11 \text{ cm}^{-1}$ para a bsPAP e $J = -14 \text{ cm}^{-1}$ para a ufPAP.

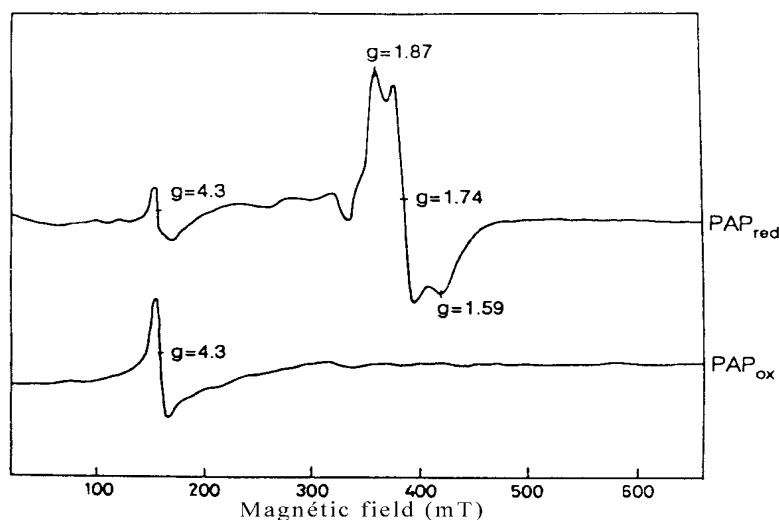


Fig. 8.9. Espectro de EPR da forma ativa (superior) e inativa (inferior) da bsPAP em $\text{pH} = 5,2$ a 5 K .

Desta forma, o EPR da PAP contribui com as seguintes evidências para a proposta do seu sítio ativo:

1. Ambiente de coordenação assimétrico (rômbico) em torno dos centros metálicos.
2. Presença de H₂O coordenada.
3. O baixo valor da constante de acoplamento antiferromagnética evidencia a presença de ponte alcoxo, fenoxo ou hidroxó unindo os centros metálicos. A presença de ponte oxo é descartada.

8.5 Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer é uma técnica que provém informações sobre transições nucleares. Ela está baseada na absorção da radiação γ emitida por uma fonte radioativa que contém um isótopo excitado do mesmo metal a ser analisado.

Um dos elementos mais estudado por espectroscopia Mössbauer é o Fe. A radiação γ utilizada para o seu estudo é proveniente do decaimento radioativo do ^{57}Fe , o qual, por sua vez, tem sua origem no ^{57}Co (Fig. 8.10). Uma das etapas do decaimento radioativo do ^{57}Fe , a qual possui $I = 3/2$, $t_{1/2} \approx 99,3$ ns e energia de 14,41 KeV torna o elemento adequado para a aplicação em espectroscopia Mössbauer.

De forma simples, a espectroscopia Mössbauer provém informações sobre a energia necessária para que ocorra transições entre spins nucleares de um dado elemento. Por isso, é uma técnica que reflete os efeitos exercidos diretamente sobre o núcleo atômico.

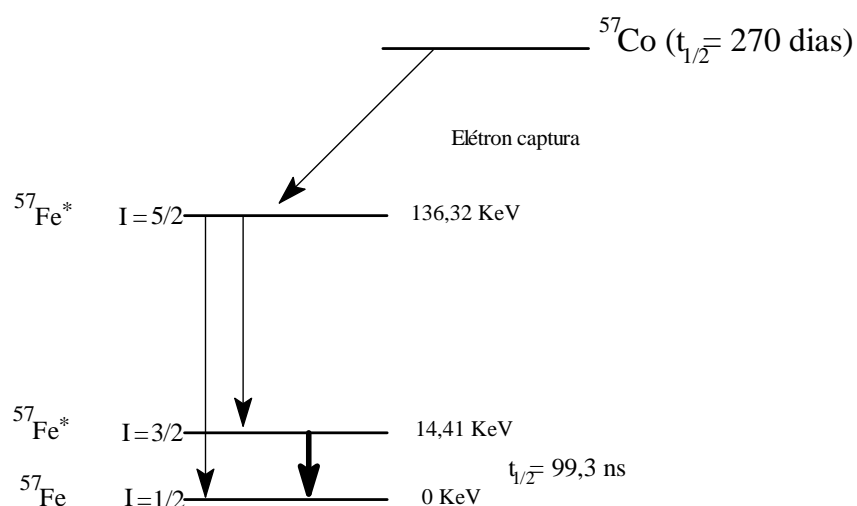


Fig. 8.10. Decaimento radioativo do ^{57}Fe originado a partir do ^{57}Co . A radiação γ de 14,41 KeV é a energia usada na espectroscopia Mössbauer.

A responsável sobre os efeitos inferidos ao núcleo atômico é a chamada coroa eletrônica ou orbitais eletrônicos. Os orbitais eletrônicos que mais influem sobre o núcleo são os orbitais s, exercendo um efeito de blindagem. Os orbitais p e d exercem um efeito significativamente menor, sendo o mesmo de desblindagem. Desta forma, qualquer alteração da coroa eletrônica, deverá influenciar a energia dos spins nucleares.

Obviamente, para um dado elemento, os orbitais eletrônicos internos são rigorosamente iguais. O que pode ser diferente é o orbital de valência, sendo estas diferenças decorrentes de vários fatores como número de oxidação, polaridade da ligação, hibridização, entre outros. Deste modo, diferenças no orbital de valência irão originar espectros diferentes, resultado da influência diferenciada sobre o núcleo atômico.

Duas informações básicas são tiradas de um espectro Mössbauer:

1. Deslocamento isomérico (δ);
2. Desdobramento quadrupolar (ΔE_q).

O deslocamento isomérico (δ) está relacionado com a influência da densidade eletrônica do orbital de valência sobre o núcleo atômico, sendo diretamente influenciado pelo estado de oxidação e pelos grupos ligantes coordenados.

No caso do ^{57}Fe , o decaimento do estado excitado ($I = 3/2$) para o estado fundamental ($I = 1/2$) libera uma energia de 14,41 KeV, a qual pode ser utilizada para realizar uma transição nuclear em uma amostra de ^{57}Fe a ser estudada. Se a amostra estudada absorver a mesma energia emitida pela fonte, significa que o ambiente eletrônico da camada de valência da amostra estudada e o da fonte são iguais. Isto leva a considerar que ambos possuem a mesma coordenação e estado de oxidação, resultando em um deslocamento isomérico igual a zero (Fig. 8.11).

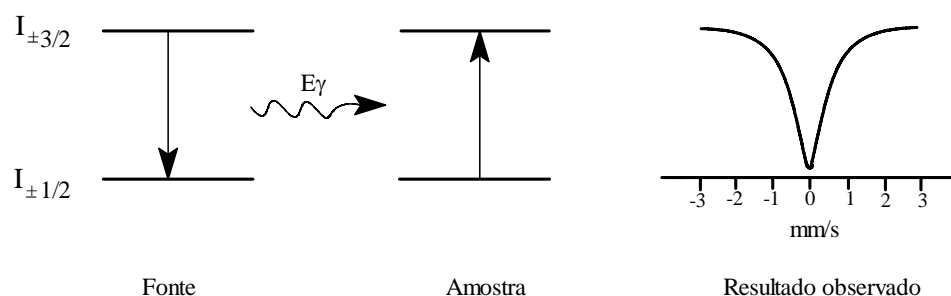


Fig. 8.11. Esquema mostrando o resultado observado quando a separação energética entre os níveis $I_{\pm 3/2}$ e $I_{\pm 1/2}$ da fonte e da amostra são iguais.

Já quando o ambiente eletrônico da camada de valência da amostra estudada é diferente do da fonte, pode ser necessário uma energia maior ou menor para que a transição ocorra. Como no caso do ^{57}Fe a energia liberada pela fonte é fixa (14,41 KeV), essa energia maior ou menor é provida pelo movimento de aproximação e/ou afastamento da fonte em relação a amostra, o que dá origem ao efeito Doppler. Esta diferença de energia dá origem a um espectro Mössbauer com deslocamento isomérico diferente de zero (Fig. 8.12).

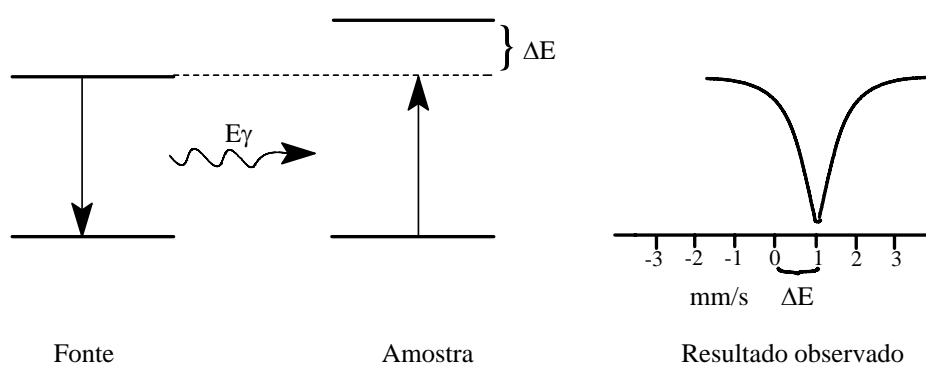


Fig. 8.12. Esquema mostrando o resultado observado quando a separação energética entre os níveis $I_{\pm 3/2}$ e $I_{\pm 1/2}$ da fonte e da amostra são diferentes.

Dependendo do valor obtido para o deslocamento isomérico, o átomo de ferro pode ser facilmente classificado quanto ao seu estado de spin e valência (Fig. 8.13).

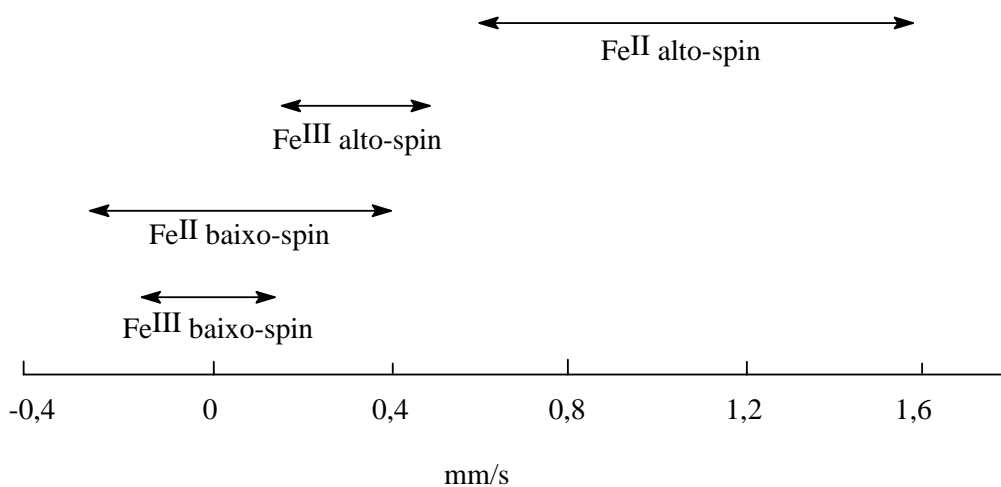


Fig. 8.13. Faixa de deslocamento isomérico (δ) para íons $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ alto e baixo spin.

Já o desdobramento quadrupolar está relacionado com a simetria de coordenação e com a ocupação eletrônica dos diversos orbitais da camada de valência, o que pode levar a uma distribuição não esférica de cargas sobre o núcleo. Isto acaba resultando em um gradiente de campo elétrico diferente de zero, fazendo com que o estado $I = 3/2$ se desdobre em $I = \pm 3/2$ e $\pm 1/2$ (Fig. 8.14).

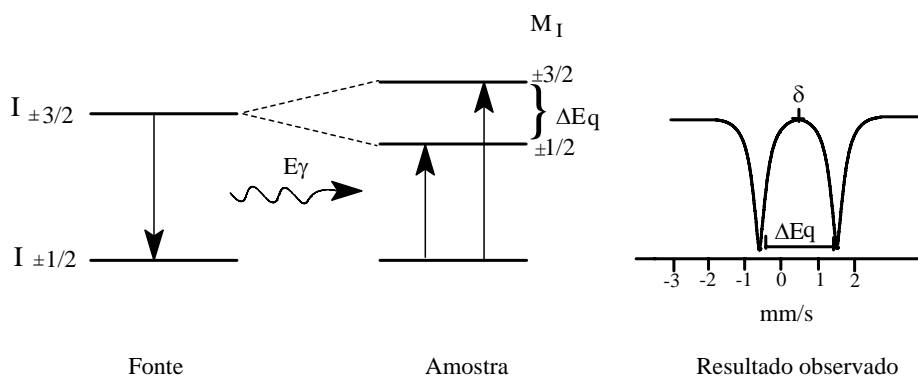


Fig. 8.14. Esquema ilustrando o resultado observado quando da presença de um gradiente de campo elétrico diferente de zero, o que por sua vez da origem ao desdobramento quadrupolar (ΔE_q).

A distribuição não esférica de cargas sobre o núcleo pode ser gerada pela contribuição de dois fatores:

1. Contribuição de rede;
2. Contribuição de valência;

Portanto:

$$\Delta E_q = q_{\text{rede}} + q_{\text{valência}}$$

A contribuição de rede (q_{rede}) resulta da coordenação assimétrica dos ligantes. A contribuição de valência ($q_{\text{valência}}$) resulta da distribuição eletrônica na camada de valência.

A contribuição de valência é resultante da soma de dois fatores:

1. Contribuição do campo cristalino;
2. Contribuição do orbital molecular;

Portanto:

$$q_{\text{valência}} = q_{\text{cc}} + q_{\text{OM}}$$

A contribuição de campo cristalino (q_{CC}) é nula quando se tem, para um complexo octaédrico de Fe^{III} as seguintes distribuições eletrônicas: $t_{2g}^6e_g^0$ e $t_{2g}^3e_g^2$.

A contribuição do campo cristalino caracteriza-se por ser um fenômeno dependente da temperatura.

Já a contribuição do orbital molecular é um fenômeno verificado quando ocorre a coordenação de grupos retiradores ou doadores de elétrons. Estes grupos podem fazer com que o número de elétrons sobre os orbitais t_{2g} e e_g torne-se fracionário devido a delocalização eletrônica, o que acaba gerando uma distorção e resulta na formação de um gradiente de campo elétrico. A contribuição de orbital molecular (q_{OM}) é um fenômeno independente da temperatura.

Com base nestas informações observa-se claramente que a espectroscopia Mössbauer é uma técnica extremamente sensível a mudanças na camada de valência, e uma das informações básicas que a técnica fornece é o estado de oxidação do átomo de Fe.

O estudo do espectro Mössbauer da ufPAP (Fig. 8.15) revelou:

1. A enzima pode apresentar-se tanto na forma de $Fe^{III}Fe^{II}$ como na forma Fe_2^{III} .
2. Presença de dois átomos de ferro com ambiente de coordenação distintos.

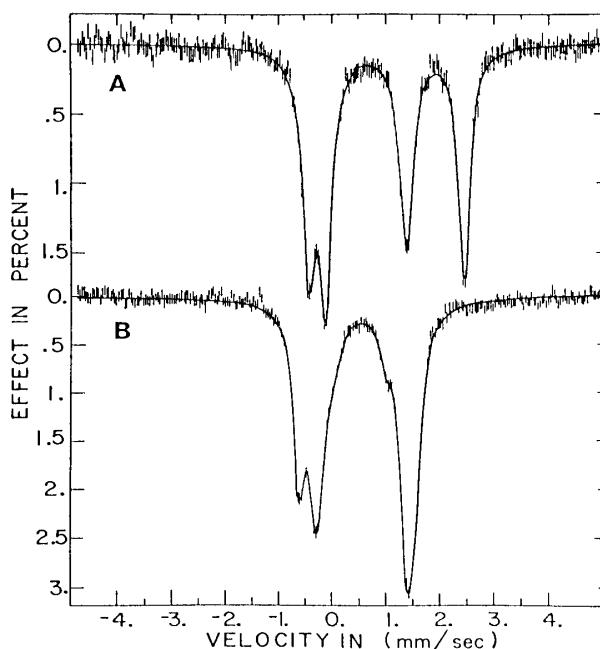


Fig. 8.15. Espectros Mössbauer da forma ativa a 185 K(A) e inativa a 10 K(B) da ufPAP.

Os valores de desdobramento quadrupolar (ΔE_q) observados, indicam que os átomos de ferro encontram-se em um ambiente de coordenação octaédrico bastante distorcidos.

Com base no espectro Mössbauer das PAPs, pode-se verificar que:

1. A enzima possui dois centros de ferro com coordenações distintas.
2. O ambiente de coordenação provavelmente é composto por oxigênio e nitrogênio.

8.6 Magnetoquímica

A análise da resposta de um dado material à presença de um campo magnético externo é uma interessante ferramenta de pesquisa que pode nos fornecer informações químicas e físicas sobre a substância a ser analisada.

A princípio, todo material pode ser incluído em duas categorias, sendo classificado como:

1. Diamagnético.
2. Paramagnético.

Substâncias diamagnéticas são caracterizadas por não possuírem elétrons desemparelhados, o que resulta em um spin líquido total $S = 0$. Já as substâncias paramagnéticas são caracterizadas por possuírem elétrons desemparelhados, o que resulta em um spin líquido total $S \neq 0$.

Se um sólido apresentar átomos com $S \neq 0$, os spins líquidos de átomos adjacentes podem se orientar de diversas formas. Se os spins se orientarem randomicamente, o sólido é chamado simplesmente de paramagnético. Já se os spins de átomos vizinhos, estiverem orientados paralelamente entre si, o sólido é chamado de ferromagnético. No entanto, se os spins adquirirem uma orientação antiparalela entre si, o sólido é classificado como antiferromagnético. Ainda se os spins tiverem orientações antiparalelas, mas apresentarem magnitudes diferentes, o material é classificado como ferrimagnético (Fig. 8.16).

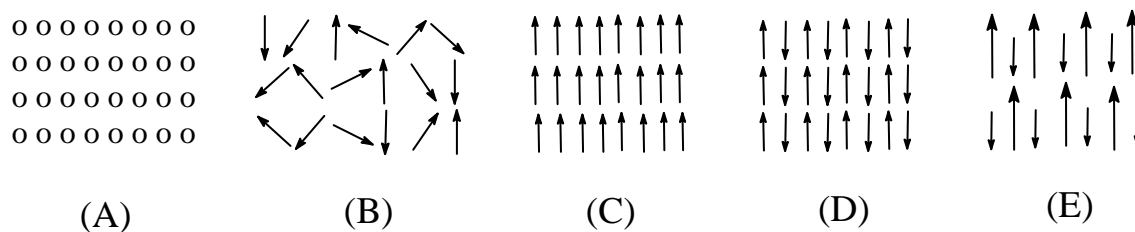


Fig. 8.16. Esquema ilustrativo mostrando como se dá a orientação do spin eletrônico de cada átomo em uma espécie (A) diamagnética, (B) paramagnética, (C) ferromagnética, (D) antiferromagnética, (E) ferrimagnética.

Quando uma substância é colocada sob a influência de um certo campo magnético, ela pode ser atraída ou repelida pelo campo magnético aplicado. Quando a substância é repelida, ela é classificada como diamagnética. Quando ela é atraída, ela é classificada como paramagnética.

Quando sob os efeitos de um campo magnético, a indução magnética sofrida pela substância pode ser expressa pela equação 4

$$B = H + 4\pi M \quad (4)$$

onde B é a indução magnética, M a magnetização e H o campo magnético aplicado.

A facilidade com que uma substância é magnetizada é avaliada pela susceptibilidade magnética, que reflete a razão entre a magnetização e a magnitude do campo magnético aplicado (equação 5).

$$\chi = M/H \quad (5)$$

Geralmente, a susceptibilidade magnética (χ) é expressa como susceptibilidade magnética por grama (χ_g) ou por mol (χ_M).

Outra informação valiosa para a magnetoquímica, é o momento magnético efetivo (μ_{eff}), o qual pode ser expresso por:

$$\mu_{\text{eff}} = 2,828(\chi_M \cdot T)^{1/2} \quad (6)$$

com a temperatura dada em Kelvin (K); através dos valores do μ_{eff} pode ser estimado o número de elétrons desemparelhados para um dado átomo.

Um experimento de grande valor, principalmente para compostos polinucleares, é a medida da susceptibilidade magnética em função da temperatura (300 – 4K). Se imaginarmos um composto binuclear, cada um dos átomos metálicos que o compõe apresentam um spin líquido individual S . Se entre os dados átomos metálicos houver interações eletrônicas, é provável que os spins líquidos de cada átomo metálico também interajam entre si, o que resultaria em um novo spin total. Se esta interação for construtiva, teremos $S_T = S_1 + S_2$ e se for destrutiva $S_T = S_1 - S_2$.

Esta interação entre os spins de cada átomo é avaliada por uma constante J chamada de constante de acoplamento, a qual é definida pela equação 7.

$$H = H_0 - 2JS_1S_2 \quad (7)$$

onde H é o operador Hamiltoniano e H_0 o valor do campo magnético aplicado.

Se o valor de J é positivo, trata-se de um composto com acoplamento ferromagnético. Se J é negativo, o composto apresenta acoplamento antiferromagnético.

O valor de J tem se mostrado de grande valia para a proposição de unidades que formam pontes entre dois átomos metálicos. Desta forma, para composto binucleares de ferro, sabe-se que $0 > J > -30 \text{ cm}^{-1}$ reflete a presença de pontes alcoxo, fenoxo ou hidroxio. Quando $-50 > J > -200 \text{ cm}^{-1}$ verifica-se a presença de ponte oxo.

A análise dos dados magnéticos das PAPS revelou:

1. Uma medida inicial com $J = -150 \text{ cm}^{-1}$ indicou a possibilidade de uma ponte oxo unindo os dois centros de ferro.
2. Medidas posteriores indicaram que a constante de acoplamento antiferromagnética (J) apresentava valores na faixa de -10 a -20 cm^{-1} , tanto para a forma oxidada como para a forma reduzida da ufPAP e bsPAP.

Com base nos dados de medidas magnéticas, pode-se confirmar que a ponte formada entre os átomos de ferro envolve uma ponte hidroxio, fenoxo ou alcoxo.

8.7 Método de Michaelis-Menten para Tratamento de Dados Cinéticos

O método de Michaelis-Menten é um tratamento matemático para o efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada por enzimas que incorpora o conceito de formação de um complexo enzima-substrato. Inicialmente desenvolvido para o tratamento de dados de reações de catálise enzimática este método pode ser aplicado também a sistemas não enzimáticos.

A velocidade de reação em sistemas enzimáticos mostra uma dependência característica com a concentração de substrato. O gráfico de velocidade inicial *versus* concentração de substrato segue uma hipérbole regular, também chamada de curva de saturação (Fig 8.17). Em baixas concentrações de substrato a velocidade inicial é proporcional ao produto das concentrações de enzima e substrato ($v=k[S][E]$) e a altas concentrações é proporcional a concentração de enzima apenas ($v=k[E]$).

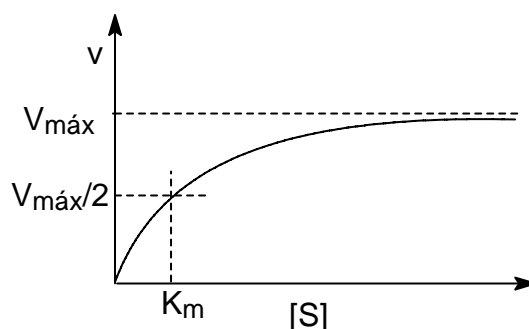
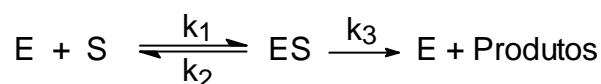


Fig. 8.17. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada por enzima.

O tratamento de Michaelis-Menten assume a formação reversível de um intermediário enzima-substrato seguido da conversão deste em enzima e produto através de uma reação de primeira-ordem.

A reação geral pode ser escrita:



onde E é a enzima livre, S é o substrato e ES o complexo enzima-substrato.

A equação geral de velocidade da reação é:

$$v = k_3[ES]$$

Porém, é necessário obter-se uma equação para velocidade, v , como uma função da concentração de substrato. Considerando que:

1) A taxa de formação de ES é dada pela expressão:

$$-d[ES]/dt = k_1[E][S], \text{ onde } [E] = [E]_{\text{total}} - [ES];$$

2) A taxa de decomposição de ES a E e S, e produtos é dada por:

$$-d[ES]/dt = k_2[ES] + k_3[ES];$$

3) Durante o período de reação onde as velocidades iniciais estão sendo medidas a concentração de substrato, a concentração de enzima livre ($= [E]_{\text{total}} - [ES]$) e a concentração de enzima total mantém-se aproximadamente constantes, o que permite assumir que a concentração do complexo enzima-substrato também é constante, ou seja, um estado estacionário.

Nestas condições a taxa de formação de ES é igual a taxa de consumo de ES:

$$k_1([E]_{\text{total}} - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

Esta pode ser rearranjada na forma:

$$([E]_{\text{total}} - [ES])[S] / [ES] = (k_2 + k_3)/k_1 = K_m$$

onde K_m é a constante de Michaelis-Menten, dada em unidade de concentração.

Desta equação pode ser isolado $[ES]$ em função de $[S]$:

$$[ES] = [E]_{\text{total}}[S] / (K_m + [S])$$

Substituindo este valor na equação geral de velocidade:

$$v = k_3[E]_{\text{total}}[S] / (K_m + [S])$$

Como a concentração total de enzima, $[E]_{\text{total}}$, nem sempre é conhecida, a equação de velocidade é convenientemente expressa em termos de $[S]$. De acordo com o modelo de Michaelis-Menten, em concentrações muito altas de substrato toda a enzima está complexada com o substrato, sendo verdadeiro que $[E]_{\text{total}} = [ES]$ e $v = V_{\text{máx}} = k_3[E]_{\text{total}}$.

A equação de Michaelis-Menten é obtida pela substituição de $k_3[E]_{\text{total}}$ por $V_{\text{máx}}$ na equação geral de velocidade:

$$v = V_{\text{máx}} [S] / (K_m + [S])$$

Esta equação relaciona quantitativamente a dependência da velocidade inicial, v , com a concentração de substrato. Em baixas concentrações de substrato, onde $[S] \ll K_m$, temos que $v = (V_{\text{máx}}/K_m)[S]$, e nestas condições o termo $V_{\text{máx}}/K_m$ representa a constante de primeira-ordem aparente da reação (k_{cat}). Numa condição em que $K_m = [S]$ a equação de Michaelis-Menten fica na forma:

$$v = V_{\text{máx}}K_m / (K_m + K_m) = V_{\text{máx}}/2$$

Portanto, K_m é igual a concentração de substrato quando a velocidade inicial, v , é metade da velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$.

Em algumas reações, onde k_1 e k_2 são muito maiores que k_3 , pode-se assumir $K_m \approx k_2/k_1$, e neste caso K_m é aproximadamente igual a constante de dissociação do complexo enzima substrato K_s , ou ainda expresso como constante de associação $K_{\text{ass}} = 1/K_m$.

A linearização da equação de Michaelis-Menten, através do método de Lineweaver Burk, é usada para a obtenção dos valores de K_m e $V_{\text{máx}}$. Um gráfico de $1/v$ versus $1/[S]$ (Fig. 8.18) resulta numa reta cuja inclinação fornece $K_m/V_{\text{máx}}$ e o intercepto do eixo vertical fornece $1/V_{\text{máx}}$.

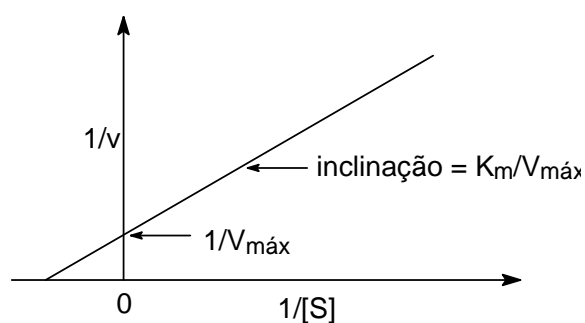


Fig. 8.18. Gráfico de $1/v$ vs. $1/[S]$ de acordo com o método de Lineweaver-Burk.

Referências Bibliográficas

- Kaim, W. & Schederski, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life*, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- Ochiai, E. I. *Química Bioinorgânica una Introducción*, Ed. Reverté, S.A., Barcelona, 1985.
- Lippard, S. J. & Berg, J. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, California, 1994.
- Cowan, J. A. *Inorganic Biochemistry an Introduction*, Ed. VCH, New York, 1993.
- Teses de Doutorado dos alunos do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC): Marcos Aires de Brito, Adolfo Horn Jr, Liane Márcia Rossi, Marciela Scaperellini, Rosmari Horner e Maurício Lanznaster, sob orientação dos Prof. Dr. Ademir Neves e Hernán Terenzi.
- Artigos da Literatura, contendo Tópicos atuais na Química Bioinorgânica.