



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA INTERAÇÃO DOS
ÍONS Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} E Pb^{2+} COM A ENZIMA
CATALASE**

Jonatas Gomes da Silva

Dissertação apresentada ao programa de
Pós – Graduação do Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre

Orientadora: Clarissa Silva Pires de Castro

BRASÍLIA , 2007



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA INTERAÇÃO DOS
ÍONS Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} E Pb^{2+} COM A ENZIMA
CATALASE**

Jonatas Gomes da Silva

Dissertação apresentada ao programa de
Pós – Graduação do Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre

Orientadora: Clarissa Silva Pires de Castro

BRASÍLIA , 2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais e meu irmão, pelo apoio.

À Dra. Clarissa Silva Pires de Castro, pela orientação prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Jurandir Rodrigues de Souza, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva do Laboratório de Espectrometria de Massa (EMBRAPA), pelo apoio fundamental no estudo teórico e em outros experimentos.

À Fátima Barreto e ao Eduardo Ferreira, pela assistência prestada no Laboratório de Química Analítica Ambiental.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental e do CENARGEN, pelo auxílio nos experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Keli de B. Alcanfor, pela amizade, incentivo e apoio desde a graduação.

À Ana Paula, Cíntia e Karine, pelo incentivo, pelo apoio e principalmente pela amizade.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial: Jocilene, Jonas e Lucas.

Aos demais colegas e amigos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao IQ/UnB e ao CENARGEN/EMBRAPA.

À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A catalase é uma enzima responsável pela redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigênio (O_2), que apresenta alguns sítios de ligação para íons metálicos (Cys, His). A ligação entre a enzima e os íons metálicos pode causar mudanças conformacionais ou estabilizar a estrutura da enzima, resultando na sua inibição ou ativação. A inibição da CAT, que ocorre com excesso de metal, contribui para o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo. Neste trabalho, foi estudado separadamente a interação dos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} com a catalase, em meio semelhante ao fisiológico, por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (DPASV), voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). Os objetivos principais deste trabalho foram verificar a existência de interações entre os íons metálicos e a CAT, determinar os parâmetros quantitativos do sistema (estequiometria, constante de dissociação (K_d) e potencial padrão de redução do complexo (E^0)) e identificar por meio de estudo teórico os possíveis sítios de ligação dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} na estrutura da catalase, com o propósito de permitir uma melhor compreensão do papel dos metais no estresse oxidativo. Os possíveis sítios de ligação do Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} na molécula de CAT foram identificados, considerando apenas os sítios sem impedimento estérico contendo resíduos de histidina e cisteína, por meio de comparação dos parâmetros físico-químicos (MM, pl e MH) de peptídeos padrão que se ligam a zinco, cobre, cádmio e chumbo e dos peptídeos gerados na clivagem da CAT com as enzimas GluC2 e V8-proteinase. A formação de um complexo estável entre o Zn^{2+} e a CAT foi verificada utilizando tanto a DPASV ($K_d = 1,62 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) quanto a CV ($K_d = 2,98 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$). Uma estequiometria de 20 íons Zn^{2+} para uma molécula de CAT foi determinada para a reação, sendo este valor bem próximo do número de possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} identificados no estudo teórico (28 possíveis sítios de ligação). A formação de um complexo estável, com estequiometria de 16 íons Cu^{2+} para uma molécula de CAT (valor bem próximo do número de possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} identificados no estudo teórico - 24 possíveis sítios de ligação), foi evidenciada pelo decaimento das correntes de oxidação/redução do metal com a adição da CAT à solução e pelo valor da constante de dissociação ($K_d = 1,73 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPASV, $K_d = 1,25 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - CV, $K_d = 1,81 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPV). A pequena diferença entre os valores teórico e experimental das estequiometrias dos complexos pode ser atribuída ao impedimento estérico de alguns sítios, considerados aptos nos estudos teóricos, ocasionada pelo tamanho da enzima e sua conformação na superfície do eletrodo e pelo pH do meio. Os valores de K_d calculados para os complexos Zn^{2+} - CAT e Cu^{2+} - CAT sugerem a participação do zinco e do cobre na inibição da enzima catalase pela formação de complexos estáveis, contribuindo desta maneira para o estresse oxidativo. Para os sistemas Cd^{2+} - CAT e Pb^{2+} - CAT não foi possível determinar a estequiometria e a constante de dissociação, pois foi observado um decaimento pouco expressivo (a corrente não foi eliminada completamente) da corrente de oxidação do cádmio e do chumbo com a adição de CAT, levando às seguintes hipóteses: os sítios de ligação para esses metais já estão ocupados, há impedimento estérico para as ligações, a interação não é estável, ou a concentração dos metais no meio não favorece a formação dos complexos com a catalase.

ABSTRACT

Catalase (CAT), which is an important enzyme that catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water (H_2O) and oxygen (O_2), contains some metal binding sites (Cys, His). The binding of metal ions to CAT can change or stabilize its secondary structure, resulting in its inhibition or activation, respectively. The inhibition of CAT, which occurs when metal ions are in excess, contributes to the increase of the generation of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress. In this work, the interaction of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} ions with catalase was investigated, near physiological conditions, by using differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV), cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The developed methodology allows the direct determination of quantitative data (stoichiometry, dissociation constant (K_d) and standard reduction potential ($E^{0'}$)) of metal ion-CAT systems and the theoretical identification of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} binding sites. The acquired data will be useful to understand the role of metal ions in the oxidative stress mediated by catalase. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} binding sites were identified in CAT, considering only the sites containing histidine and cysteine residues without steric impediment, through comparison of physical-chemical parameters (MM, pI e MH) of standard peptides that bind zinc, copper, cadmium and lead ions and those from the peptides generated by the cleavage of CAT with GluC2 and V8-proteinase enzymes. The formation of a stable complex between zinc and catalase, with a stoichiometry of 20 Zn^{2+} ions per one CAT, was attested by using DPASV ($K_d = 1,62 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) and CV ($K_d = 2,98 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$). The formation of a stable complex between copper and catalase, with a stoichiometry of 16 Cu^{2+} ions per one CAT molecule, was attested by the decrease of oxidation/reduction currents of the metal with incremental additions of catalase and by the dissociation constant ($K_d = 1,73 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPASV, $K_d = 1,25 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - CV, $K_d = 1,81 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPV). The small difference between theoretical (28 Zn^{2+} : 1 CAT; 24 Cu^{2+} : 1CAT) and experimental stoichiometry values found for these complexes can be assigned to the steric impediment of some sites identified in the theoretical studies, caused by the size of the enzyme and its conformation on the electrode surface and by the pH of the medium. The calculated K_d values for Zn^{2+} - CAT and Cu^{2+} - CAT complexes suggest the involvement of these two metal ions in the inhibition of catalase by the formation of a stable complex with the enzyme, contributing in this way to the oxidative stress. For Cd^{2+} - CAT and Pb^{2+} - CAT systems, it was not possible to determine the stoichiometry and dissociation constant, because it was observed a small decrease (the oxidation current was not completely eliminated) of the oxidation currents of cadmium and lead in the presence of CAT in the voltammograms, taking to the following hypotheses: the binding sites for these metals ions have already been occupied, there is a steric impediment for the bindings, the interactions are not stable, or the concentration of metal ions in solution does not allow the interactions with catalase.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
I – Introdução	1
II – Objetivos do Trabalho	2
III – Revisão Bibliográfica	4
1. Estresse Oxidativo	4
1.1 Espécies reativas de oxigênio	4
1.2 Antioxidantes	5
1.3 Estresse oxidativo e metais	10
2. Complexo Proteína – Metal e Peptídeo – Metal	18
2.1 Interação de íons metálicos com peptídeos	19
2.2 Interação de íons metálicos com proteínas	22
3. Voltametria	24
3.1 Técnicas Voltamétricas	24
3.1.1 Polarografia clássica ou de corrente contínua	25
3.1.2 Voltametria de pulsos	27
3.1.2.1 Voltametria de pulso normal	28
3.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial	29
3.1.2.3 Voltametria de onda quadrada	30
3.1.3 Voltametria de redissolução	31
3.1.3.1 Técnicas de redissolução adsorptivas	33
3.1.4 Voltametria cíclica	33
3.2 Titulação Amperométrica	36
4. Estudos de Proteínas e Peptídeos por Voltametria	37
4.1 Estudos qualitativos	37
4.2 Estudos quantitativos	38
4.2.1 Biossensores a base de catalase	40
IV - Experimental	40
1. Material	41
2. Metodologia	45

V – Resultados e Discussão	57
1. Preparação da Enzima Catalase	57
2. Estudo Teórico Sobre os Possíveis Sítios de Ligação de Íons Metálicos na Catalase	60
3. Determinação das Condições e dos Parâmetros Experimentais Ótimos para o Estudo Voltamétrico da Interação dos Íons Metálicos com a Enzima Catalase	73
3.1 Eletrólito suporte	73
3.2 Tempo de equilíbrio	75
4. Estudo da Interação dos Íons Metálicos com a Catalase	76
4.1 Sistema Zn^{2+} - CAT	76
4.1.1 Estudo da interação do íon Zn^{2+} com a CAT por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial	76
4.1.2 Estudo da interação do íon Zn^{2+} com a CAT por voltametria cíclica	78
4.1.3 Cálculo da constante de dissociação (K_d) do complexo Zn^{2+} - CAT e do E^0	84
4.2 Sistema Cu^{2+} - CAT	87
4.2.1 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial	87
4.2.2 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria cíclica	88
4.2.3 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria de pulso diferencial	92
4.2.4 Cálculo da constante de dissociação (K_d) do complexo Cu^{2+} - CAT e do E^0	95
4.3 Sistemas Cd^{2+} – CAT e Pb^{2+} – CAT	97
VI – Conclusão	100
VII – Etapas Posteriores	102
VIII – Referências Bibliográficas	103
IX - Anexos	110
1. Estrutura Química dos Aminoácidos	110
2. Localização dos Possíveis Sítios de Ligação de Íons Metálicos na Estrutura da Catalase	113
3. Trabalhos Publicados	117

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

Asp	–	Ácido Aspártico
ASV	–	Voltametria de redissolução anódica
BSA	–	Albumina sérica bovina
CAT	–	Catalase
CCS	–	Consenso de escalas combinadas
CV	–	Voltametria cíclica
Cys	–	Cisteína
DC	–	Corrente contínua
DME	–	Eletrodo gotejante de mercúrio
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DP	–	Pulso diferencial
DPASV	–	Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial
DPV	–	Voltametria de pulso diferencial
E^0	–	Potencial padrão de redução
$E^{0'}$	–	Potencial padrão de redução do complexo M^{2+} – CAT
E_d	–	Potencial de deposição
E_f	–	Potencial final
E_i	–	Potencial inicial
E_{oxi}	–	Potencial de oxidação
E_{pa}	–	Potencial do pico anódico
E_{pc}	–	Potencial do pico catódico
ERO	–	Espécies reativas de oxigênio
E_w	–	Potencial de inversão
Glu	–	Ácido Glutâmico
Gly	–	Glicina
GPx	–	Glutaciona peroxidase
GR	–	Glutaciona redutase
GSH	–	Glutaciona
GST	–	Glutaciona S - tranferase
HEPES	–	N - (2-hidroxietyl) piperazina - N' - (2 - ácido etanosulfônico)

His	– Histidina
HMDE	– Eletrodo de mercúrio gota pendente
i_d	– Corrente de difusão
I_{pa}	– Corrente de pico anódico
I_{pc}	– Corrente de pico catódico
K_d	– Constante de dissociação
m/z	– Relação massa/carga
MH	– Momento Hidrofóbico
MM	– Massa Molecular
MT	– Metalotioneínas
NP	– Pulso normal
NPV	– Voltametria de pulso normal
P.E.	– Ponto de equivalência
PC	– Fitoquelatinas
pI	– Ponto Isoelétrico
SCE	– Eletrodo de calomelano saturado
SOD	– Superóxido dismutase
SWV	– Voltametria de onda quadrada
t_d	– Tempo de deposição
Trizma HCl	– 2-Amino - 2 - Hidroximetil -1,3 - Propanodiol - HCl
Tyr	– Tirosina
UV-Vis	– Ultravioleta-visível
v	– Velocidade de varredura
$v^{1/2}$	– Raiz quadrada da velocidade de varredura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas patologias relacionadas com o estresse oxidativo	9
Tabela 2.	Cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos	19
Tabela 3.	Peptídeos que interagem com íons metálicos	22
Tabela 4.	Proteínas que interagem com íons metálicos	23
Tabela 5.	Utilização da voltametria no estudo qualitativo de proteínas	37
Tabela 6.	Utilização da voltametria no estudo quantitativo de proteínas e peptídeos	39
Tabela 7.	Reagentes	41
Tabela 8.	Condições experimentais ótimas utilizadas no estudo do tempo de equilíbrio	51
Tabela 9.	Parâmetros ótimos utilizados nos ensaios com diversos eletrólitos suporte, no estudo do tempo de equilíbrio e na análise por DPASV	53
Tabela 10.	Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por DPASV	53
Tabela 11.	Parâmetros ótimos utilizados na análise por CV	55
Tabela 12.	Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por CV	55
Tabela 13.	Parâmetros ótimos utilizados na análise por DPV	56
Tabela 14.	Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por DPV	56
Tabela 15.	Valores médios (n =3) de absorvância da solução de catalase	58
Tabela 16.	Peptídeos que se ligam aos íons metálicos Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ e Pb ²⁺	60
Tabela 17.	Parâmetros físico-químicos dos peptídeos utilizados como padrões no estudo teórico	63
Tabela 18.	Parâmetros físico-químicos dos peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima GluC2	65

Tabela 19.	Parâmetros físico-químicos dos peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima V8-proteinase	66
Tabela 20.	Possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} na catalase	68
Tabela 21.	Possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} na catalase	70
Tabela 22.	Possíveis sítios de ligação do íon Pb^{2+} na catalase	71
Tabela 23.	Possíveis sítios de ligação do íon Cd^{2+} na catalase	71
Tabela 24.	Sítios de ligação de íons metálicos iguais para dois ou mais íons metálicos	72
Tabela 25.	Sítios de ligação de íons metálicos localizados na parte externa da estrutura da catalase	73
Tabela 26.	Valores de K_d calculados para a interação Zn^{2+} – CAT utilizando o método de Saroff e Mark	85
Tabela 27.	Valores de potencial padrão de redução para o complexo Zn^{2+} – CAT	86
Tabela 28.	Valores de K_d calculados para a interação Cu^{2+} – CAT utilizando o método de Saroff e Mark	96
Tabela 29.	Valores de potencial padrão de redução para o complexo Cu^{2+} – CAT	96
Tabela 30.	Estrutura química dos aminoácidos	110
Tabela 31.	Localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	a) Estrutura tridimensional da enzima SOD – manganês; b) Estrutura tridimensional da enzima SOD - cobre e zinco.	6
Figura 2.	Estrutura tridimensional da enzima GPx.	7
Figura 3.	Estrutura da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).	7
Figura 4.	Estrutura tridimensional da enzima CAT hémica.	8
Figura 5.	Estrutura do grupo heme.	8
Figura 6.	Interação das ERO com as enzimas antioxidantes.	10
Figura 7.	Sintomas visuais de fitotoxicidade observados nas folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	11
Figura 8.	Atividade da a) SOD e b) CAT em <i>Allium cepa</i> exposto a diferentes concentrações dos metais Hg, Cd, Pb e Cr.	12
Figura 9.	Atividade das enzimas antioxidantes de <i>Allium cepa</i> exposta a diluições consecutivas da amostras de água coletada em um parque industrial.	13
Figura 10.	Atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT de <i>Populus x canescens</i> exposta a cádmio.	14
Figura 11.	Efeito de CdCl ₂ em algumas enzimas antioxidantes em células de fígado de rato em tampão fosfato pH = 7,00 (n = 3).	15
Figura 12.	Efeito do pH na atividade da CAT em diferentes tecidos de <i>O. niloticus</i> .	16
Figura 13.	Atividade da CAT em tecido de fígado de <i>O. niloticus in vitro</i> .	17
Figura 14.	Estrutura geral de um aminoácido.	18
Figura 15.	Ligação peptídica.	18
Figura 16.	Complexação do íon metálico com um dipeptídeo com cadeias laterais não complexantes.	20
Figura 17.	Complexação do íon Cu ²⁺ com o tripeptídeo Gly-Gly-His.	21
Figura 18.	Polarografia: aparelhagem básica.	25

Figura 19.	a) Sinal de excitação da polarografia clássica, varredura linear; b) Polarograma característico.	26
Figura 20.	a) Sinal de excitação da voltametria de pulso normal; b) Voltamograma característico da NPV.	28
Figura 21.	Sinal de excitação da voltametria de pulso diferencial. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.	29
Figura 22.	Voltamograma característico da DPV.	29
Figura 23.	a) Escada de potencial; b) Onda quadrada c) Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada.	30
Figura 24.	Voltamograma característico da SWV.	31
Figura 25.	Sinal de excitação para a determinação do M^{2+} por redissolução anódica.	32
Figura 26.	Voltamograma DPASV do zinco, cádmio, chumbo e do cobre.	33
Figura 27.	Sinal de excitação para a CV. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.	34
Figura 28.	Voltamograma característico da voltametria cíclica.	34
Figura 29.	Voltamogramas característicos para processos redox: a) reversíveis; b) quasi - reversíveis; c) irreversíveis.	35
Figura 30.	Curvas típicas de titulações amperométricas: a) o analito é eletroativo e o titulante não; b) o titulante é eletroativo e o analito não; c) o reagente e o analito são eletroativos.	36
Figura 31.	Célula eletroquímica utilizada nos experimentos voltamétricos.	45
Figura 32.	Modelo geral para clivagem enzimática.	48
Figura 33.	Diagrama esquemático do procedimento adotado nos ensaios com os diversos eletrólitos suporte.	49
Figura 34.	Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo do tempo de equilíbrio.	50
Figura 35.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na titulação amperométrica do íon M^{2+} com a CAT.	52
Figura 36.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na titulação amperométrica do íon M^{2+} com a CAT e no estudo do processo de oxidação do M^{2+} na presença da CAT.	54

Figura 37.	Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo do processo de oxidação-redução do M^{2+} na ausência da CAT.	54
Figura 38.	Espectro de massa MALDI – TOF para a solução de catalase: a) antes da diálise; b) depois da diálise.	57
Figura 39.	Gráfico tridimensional dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos padrões e dos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima GluC2.	67
Figura 40.	Gráfico tridimensional dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos padrões e dos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima V8-proteinase.	67
Figura 41.	Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e os possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} .	68
Figura 42.	Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e os possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} .	69
Figura 43.	Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e possíveis sítios de ligação dos íons Pb^{2+} e Cd^{2+} .	70
Figura 44.	Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.	74
Figura 45.	Estudo do tempo para o sistema M^{2+} – CAT atingir o equilíbrio.	76
Figura 46.	Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.	77
Figura 47.	Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com a catalase.	78
Figura 48.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	79
Figura 49.	Curvas de titulação amperométrica de 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com a catalase: a) Corrente catódica; b) Corrente anódica.	80
Figura 50.	Localização dos possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} na estrutura da catalase identificados no estudo teórico.	81

Figura 51.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00.	82
Figura 52.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL Zn^{2+} de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00 na presença de 100 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	83
Figura 53.	Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.	87
Figura 54.	Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase.	88
Figura 55.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	89
Figura 56.	Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase.	90
Figura 57.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00.	91
Figura 58.	Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00 na presença de 100 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	91
Figura 59.	Voltamogramas de pulso diferencial para 50 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 10 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	93
Figura 60.	Curva de titulação amperométrica de 50 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase.	94
Figura 61.	Localização dos possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} na estrutura da catalase identificados no estudo teórico.	95
Figura 62.	Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 200 μL de Cd^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 5 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	97

Figura 63. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 200 μL de Pb^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00 com adições de 5 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. 98

Figura 64. Curvas de titulação amperométrica: a) 200 μL de Cd^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00 com a catalase. b) 200 μL de Pb^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00 com a catalase. 99

I - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas vem aumentando o interesse pelos estudos dos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), devido às descobertas dos efeitos nocivos dos radicais livres, mais conhecidos como espécies reativas de oxigênio, no organismo. As ERO são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica, sendo o seu excesso prejudicial, pois podem provocar diversas patologias como o câncer e a disfunção cerebral.

Dos antioxidantes enzimáticos destaca-se a enzima catalase, que tem a função de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigênio (O_2), desempenhando um papel importante no combate ao estresse oxidativo, evitando possíveis danos celulares causados pelo excesso de H_2O_2 .

Alguns estudos que serão discutidos na revisão bibliográfica avaliaram a atividade da CAT, presente em diferentes tecidos de plantas ou animais, na presença de alguns metais (cobre, chumbo, cádmio, mercúrio, cromo, zinco e prata). Foi observada, dependendo do metal e de sua concentração no meio celular, uma redução da atividade da enzima, tendo como consequência o aumento das ERO, ocasionando o estresse oxidativo. A redução da atividade da catalase observada na presença de metais pode ser atribuída: às mudanças conformacionais em sua estrutura, sendo este um fator crítico para sua atividade catalítica; ou à ligação dos íons metálicos com os grupos tiol e imidazol presentes na molécula da enzima. No entanto, é muito importante também ressaltar a participação dos metais na indução do estresse oxidativo por meio da geração do radical hidroxila pelas reações de Fenton e Haber-Weiss.

Os estudos realizados até o momento não são conclusivos, principalmente em relação ao papel dos íons metálicos na ativação ou inibição da enzima catalase, pois não se encontra na literatura trabalhos realizados para verificar a complexação da catalase com os íons metálicos, nem os parâmetros quantitativos (K_d e estequiometria) dos complexos formados com a enzima e nem os possíveis sítios de ligação de íons metálicos em sua estrutura. Estes parâmetros são essenciais para uma melhor compreensão do papel dos metais no estresse oxidativo.

Neste contexto, propõe-se o estudo da interação dos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} com a enzima catalase utilizando técnicas voltamétricas e softwares. A determinação dos parâmetros quantitativos dos complexos metálicos (estequiometria, K_d e E^0) em meio semelhante ao fisiológico e a previsão teórica dos sítios de ligação desses metais na catalase possibilitará uma melhor compreensão do mecanismo de resposta das enzimas antioxidantes, frente às ERO, na presença e na ausência de metais.

As propriedades que as técnicas voltamétricas apresentam (técnica não-destrutiva, excelente sensibilidade, tempo de análise curto e uma teoria desenvolvida para estimar de forma precisa os valores de parâmetros desconhecidos) permitem o seu uso no estudo da interação de íons metálicos com proteínas e peptídeos, gerando parâmetros quantitativos desconhecidos (estequiometria, K_d e E^0).

II – OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo principal estudar a interação dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} com a enzima catalase de fígado bovino utilizando técnicas voltamétricas.

Sistemas que serão estudados:

- 1) Zn^{2+} - Catalase
- 2) Cu^{2+} - Catalase
- 3) Cd^{2+} - Catalase
- 4) Pb^{2+} - Catalase

Para a investigação destes sistemas, foram propostas as seguintes etapas de trabalho:

1) Preparação da enzima catalase

- Verificar a pureza da enzima.
- Purificar a enzima.
- Padronizar a solução de enzima.

2) Estudo teórico sobre os possíveis sítios de ligação dos metais na catalase

- Identificar por meio de estudo teórico e de softwares os possíveis sítios de ligação dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} na estrutura da catalase.

3) Determinação das condições e dos parâmetros experimentais ótimos para o estudo voltamétrico dos complexos

- Determinar as seguintes condições experimentais: eletrólito suporte, pH, volumes e concentrações das soluções de metais e da enzima e o tempo necessário para os complexos $M^{2+} - CAT$ atingirem o equilíbrio.
- Determinar os seguintes parâmetros experimentais: técnica voltamétrica, tempo de deposição, tempo de equilíbrio, amplitude do pulso, tempo de vida da gota, área da gota, velocidade de varredura, potencial de deposição, potencial inicial, potencial final e potencial de inversão.

4) Estudo da interação dos íons metálicos com a catalase

- Realizar titulações amperométricas do íon metálico com a enzima.
- Determinar os parâmetros quantitativos do sistema (estequiometria, K_d e E^0) utilizando técnicas voltamétricas.

III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ESTRESSE OXIDATIVO

1.1 Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados na camada de valência.¹ Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis e quimicamente muito reativas, o que possibilita o ataque a lipídeos, a proteínas e ao DNA, comprometendo processos biológicos importantes.^{2,3}

Moléculas onde o elétron desemparelhado se encontra no átomo de oxigênio são chamadas de espécies reativas de oxigênio; no entanto, o termo ERO abrange dois grupos, as radicalares: Hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet); e as não radicalares: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO).³

O radical hidroxila é considerado a ERO mais reativa na indução de lesões em sistemas biológicos.^{2,4} O ataque intensivo e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA e como consequência o desenvolvimento de câncer em seres humanos.

O peróxido de hidrogênio é gerado *in vivo* pela dismutação do radical superóxido por enzimas oxidases. Apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas, além de participar da reação que produz o radical hidroxila.^{4,5}

A geração das ERO no organismo ocorre via ação catalítica de enzimas, pela exposição a fatores exógenos (ozônio, medicamentos, cigarro e radiações gama e ultravioleta) e por processos patológicos.⁶

O mecanismo mais importante para a geração do radical hidroxila é a reação de Fenton. Nesta reação o íon de um metal de transição reage com o peróxido de hidrogênio para gerar o radical hidroxila e um íon do metal oxidado

(M^{n+1}), como mostrado na equação 1. Em nosso organismo o Cu^{2+} e o Fe^{2+} são os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação.⁷⁻⁹



Um segundo mecanismo para a geração do radical hidroxila é a reação de Haber–Weiss. Nesta reação, um íon metálico oxidado (M^{n+1}) é reduzido pelo radical superóxido (Equação 2) gerando oxigênio. Na segunda etapa, o íon metálico reduzido (M^{n+}) reage com peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila pela reação de Fenton (Equação 3).^{7,9}



1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes protetores das células contra os efeitos das ERO, que podem ser produzidos pelo organismo ou absorvidos por dieta. Os antioxidantes produzidos pelo organismo são classificados em enzimáticos (Superóxido dismutase, Glutaciona peroxidase e Catalase) e não - enzimáticos (Glutaciona, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro como a transferrina e ferritina). Dentre os antioxidantes absorvidos da dieta podemos destacar o ácido ascórbico, os flavonóides e o β -caroteno.^{3,10} O uso de medicamentos, o tabagismo, o consumo de álcool e a poluição do ar podem diminuir os níveis de antioxidantes no organismo, no entanto, esses níveis podem ser restabelecidos com dietas apropriadas.¹¹

Os organismos eucarióticos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutaciona peroxidase que reagem com as ERO e protegem, portanto, as células e os tecidos.

A superóxido dismutase está presente no organismo em duas formas: SOD – cobre e zinco e a SOD – manganês (Figura 1); ambas atuando como catalisadores na dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (Equação 4).⁴

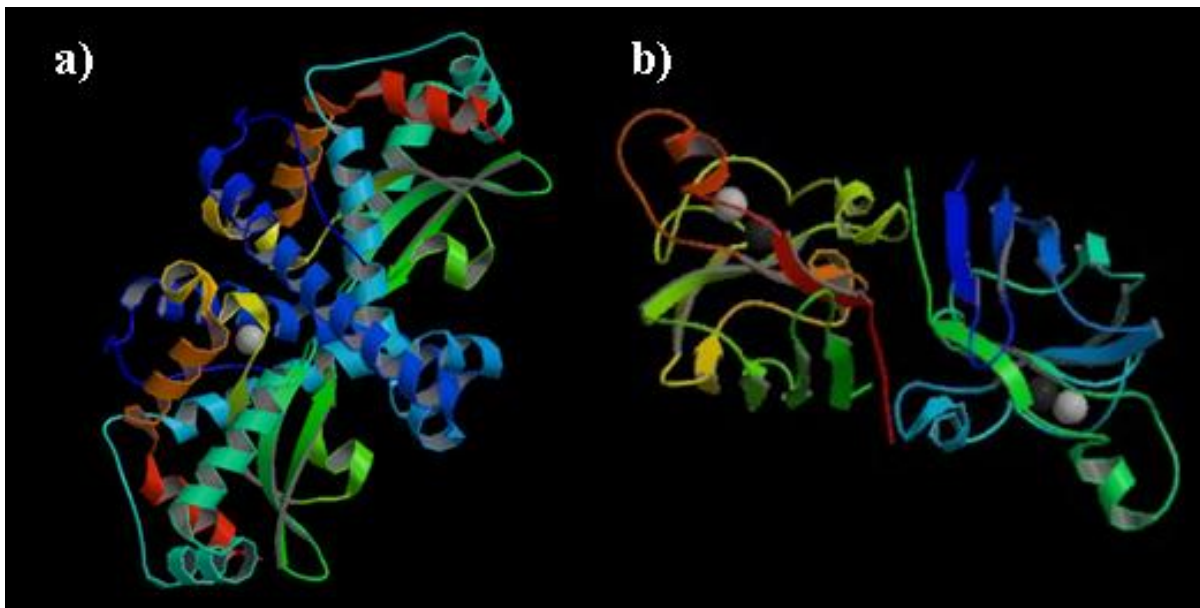
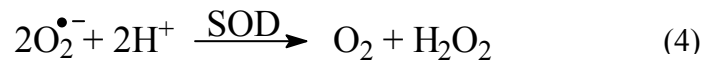
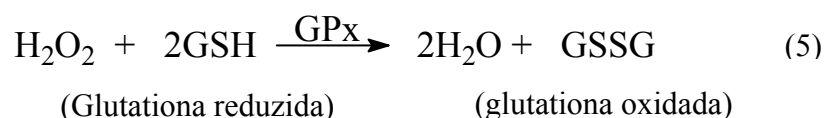


Figura 1. a) Estrutura tridimensional da enzima SOD – manganês; b) Estrutura tridimensional da enzima SOD - cobre e zinco.

[Retirado de <http://www.rcsb.org/pdb>]

A glutationa peroxidase (Figura 2) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a água ou álcool (Equação 5).⁴ Esta enzima remove H_2O_2 pela oxidação da GSH ao dímero GSSG (Figura 3), sendo este processo complementado pela GR, a qual é responsável pela redução da GSSG a GSH.¹²



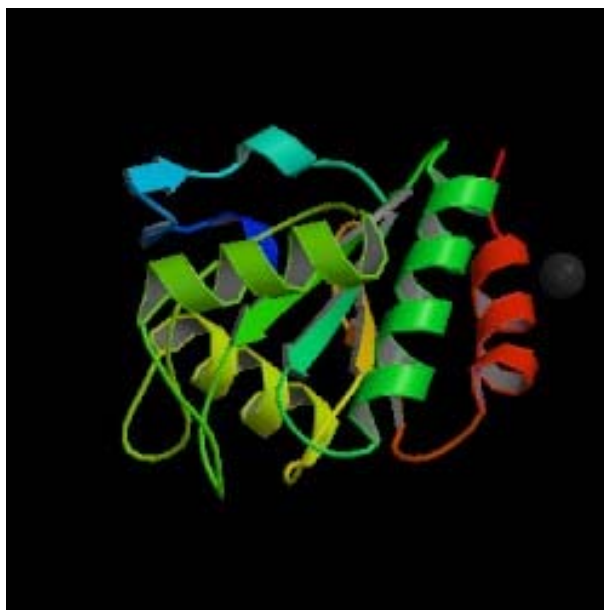


Figura 2. Estrutura tridimensional da enzima GPx.
 [Retirado de <http://www.rcsb.org/pdb>]

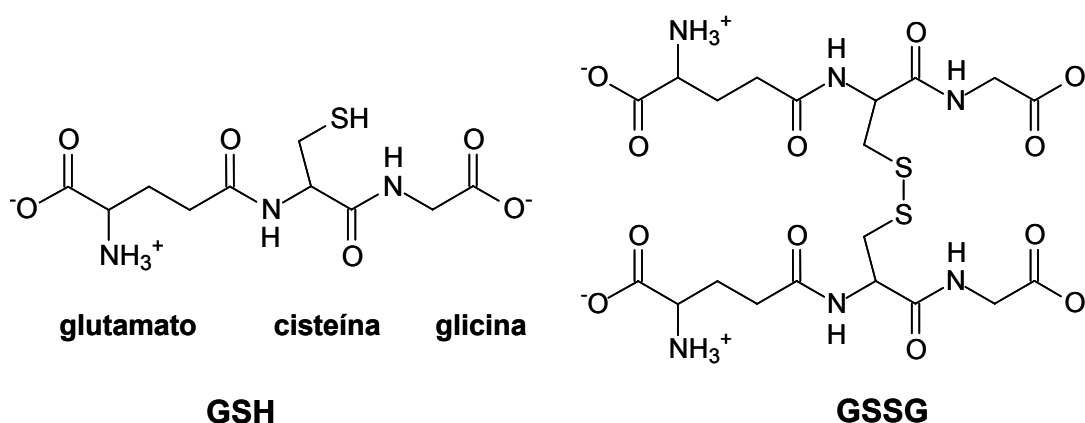


Figura 3. Estrutura da glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

A catalase tem como função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Equação 6). Esta enzima é encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, no rim e no fígado,^{4,13} e pode converter até 6 milhões de moléculas de H₂O₂.² O tipo mais comum de CAT é uma tetrâmero com cerca de 240 kDa de massa molecular, possuindo quatro cadeias polipeptídicas idênticas na sua estrutura (Figura 4). Cada cadeia polipeptídica, com cerca de 60 kDa de massa molecular, possui um grupo heme com o íon Fe³⁺ atuando como centro redox (Figura 5). Algumas CAT são não-hémicas, possuindo em vez do grupo heme um centro binuclear de manganês.^{14,15}

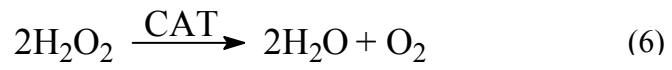


Figura 4. Estrutura tridimensional da enzima CAT hémica.
 [Retirado de <http://www.rcsb.org/pdb>]

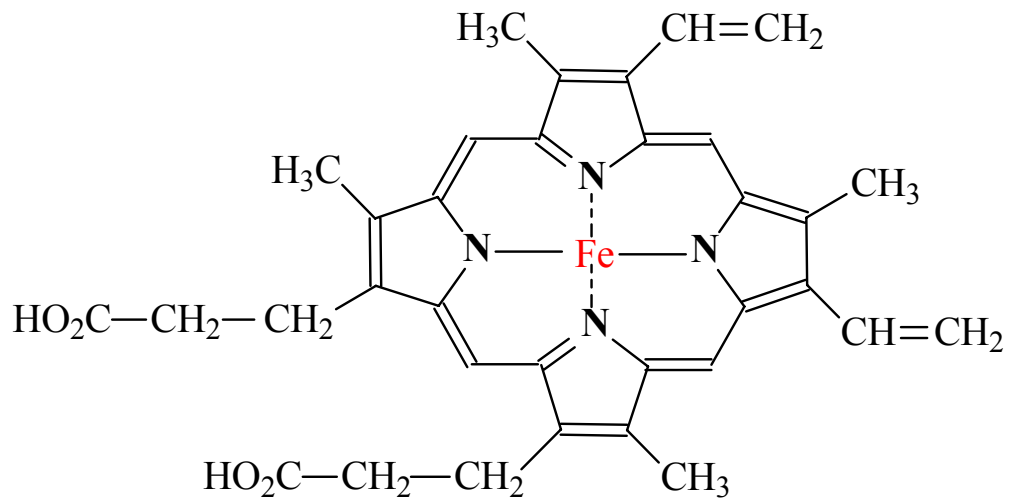
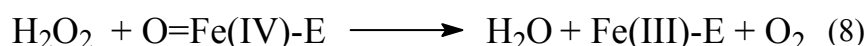
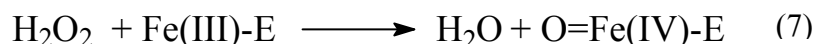


Figura 5. Estrutura do grupo heme.

Na reação catalisada pela CAT a desprotonação do H₂O₂ ocorre em duas etapas (Equações 7 e 8). Na primeira etapa, o H₂O₂ é reduzido a H₂O com concomitante oxidação da enzima. O produto desta oxidação (O = Fe(IV)-E) é muito oxidante e reage com uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio formando O₂ e uma segunda molécula de H₂O, completando assim o ciclo catalítico.¹⁶⁻¹⁹



Fe(III)-E = centro metálico do grupo heme

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelas ERO é conhecido como estresse oxidativo.² O estresse oxidativo está relacionado com várias patologias (Tabela 1).³

Tabela 1. Algumas patologias relacionadas com o estresse oxidativo

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

A Figura 6 ilustra a formação das ERO pelas reações de Fenton e Haber Weiss com a participação dos íons metálicos e ao mesmo tempo a atuação das enzimas antioxidantes no combate a formação das ERO (OH[•] e H₂O₂), pela dismutação do radical superóxido por meio da SOD e do peróxido de hidrogênio por meio da CAT e GPx, evitando dessa forma a formação do radical hidroxila e consequentemente o estresse oxidativo.

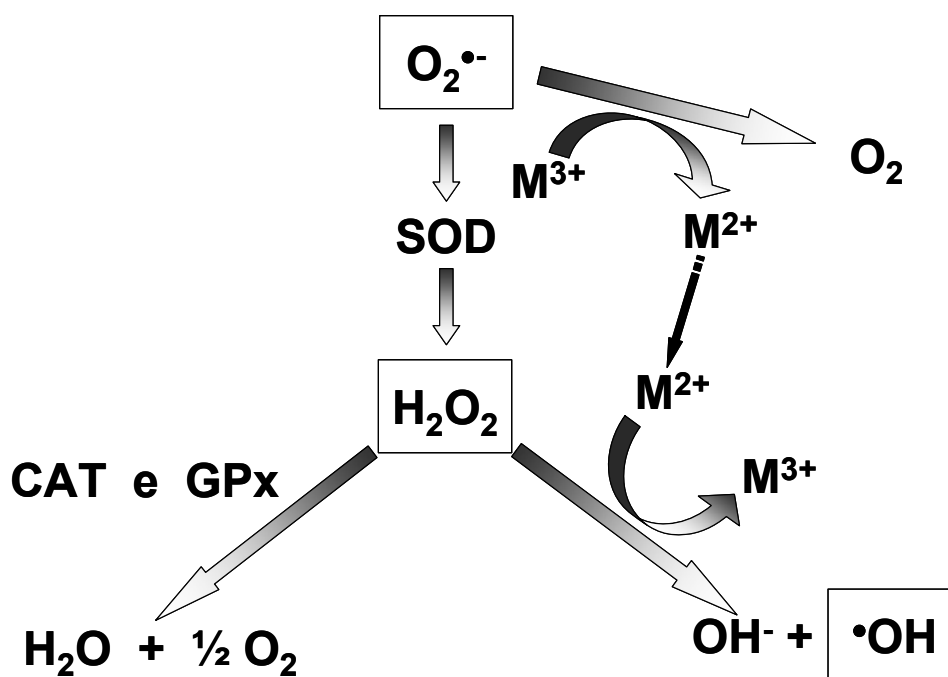


Figura 6. Interação das ERO com as enzimas antioxidantes.

M^{n+} - íon metálico; SOD - Superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - Glutathione peroxidase.

1.3 Estresse oxidativo e metais

A toxicidade de alguns metais como o cromo, mercúrio, vanádio, níquel, cádmio, chumbo e outros, pode estar relacionada com a sua participação nas reações de Fenton e Haber-Weiss (Equações 1, 2 e 3), gerando o radical hidroxila. No entanto, estes metais também podem estar envolvidos na ativação ou inibição de enzimas antioxidantes, contribuindo em ambos os casos para o estresse oxidativo.

O zinco é o componente estrutural da enzima SOD, que catalisa a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (Equação 4), desempenhando um papel antioxidante importante ao evitar a produção das ERO.²⁰ A deficiência de zinco resulta no aumento da geração das ERO levando ao estresse oxidativo.²¹

O cobre é um componente essencial de várias enzimas antioxidantes, mas também participa da reação de geração das ERO. O excesso de cobre é responsável pelo estresse oxidativo que está relacionado com o processo de carcinogênese e com mudanças neurodegenerativas.²² A deficiência desse metal também pode causar danos celulares.²³

O chumbo é um metal não essencial para o homem e altamente tóxico, mesmo em baixas concentrações, e a sua toxicidade pode estar relacionada com a formação das ERO.^{22, 24}

O cádmio é um metal altamente tóxico e é incapaz de gerar os radicais livres de forma direta, porém alguns estudos confirmaram a sua participação na geração de peróxido de hidrogênio, que passa a ser uma fonte significativa de radicais livres pela reação de Fenton.^{22,24}

A seguir serão discutidos alguns estudos que avaliaram a atividade da CAT, presente em diferentes tecidos de plantas ou animais, na presença de alguns metais (cobre, chumbo, cádmio, mercúrio, cromo, zinco e prata). Um método geral para o estudo da atividade da catalase se baseia na medida do decaimento na concentração do H_2O_2 , por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm.

Drazkiewicz e colaboradores²⁵ em estudos com folhas de *Arabidopsis thaliana* observaram, na presença de excesso de cobre, a redução da atividade da enzima antioxidante catalase e como consequência um aumento das ERO. Sintomas visuais de fitotoxicidade, como necrose e coloração violeta nas folhas (Figura 7), foram observados como consequência do estresse oxidativo.



Figura 7. Sintomas visuais de fitotoxicidade observados nas folhas de *Arabidopsis thaliana*. A – planta de controle; B – planta exposta a 70 μ M Cu; C – planta exposta a 300 μ M Cu por 7 dias. [Retirado de Drazkiewicz, M.; Skorzynska-Polit, E. S.; Krupa, Z.; *Springer Netherlands* **2004**, 17, 379.]

Marchlewicz e colaboradores²⁶ estudaram em rato, a influência do chumbo na formação das ERO, e constataram danos celulares em tecidos que podem ser associados à produção das ERO.

Fatima e Ahmad²⁷ avaliaram a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT de *Allium cepa* (cebola) quando expostas a certos metais. A SOD e a CAT não apresentaram um aumento muito significativo em suas atividades em baixas concentrações de metal, porém em concentrações de metal mais elevadas, estas enzimas apresentaram uma redução em suas atividades (Figura 8), sendo o cádmio o metal que mais contribuiu para a redução da atividade da CAT, levando ao estresse oxidativo.

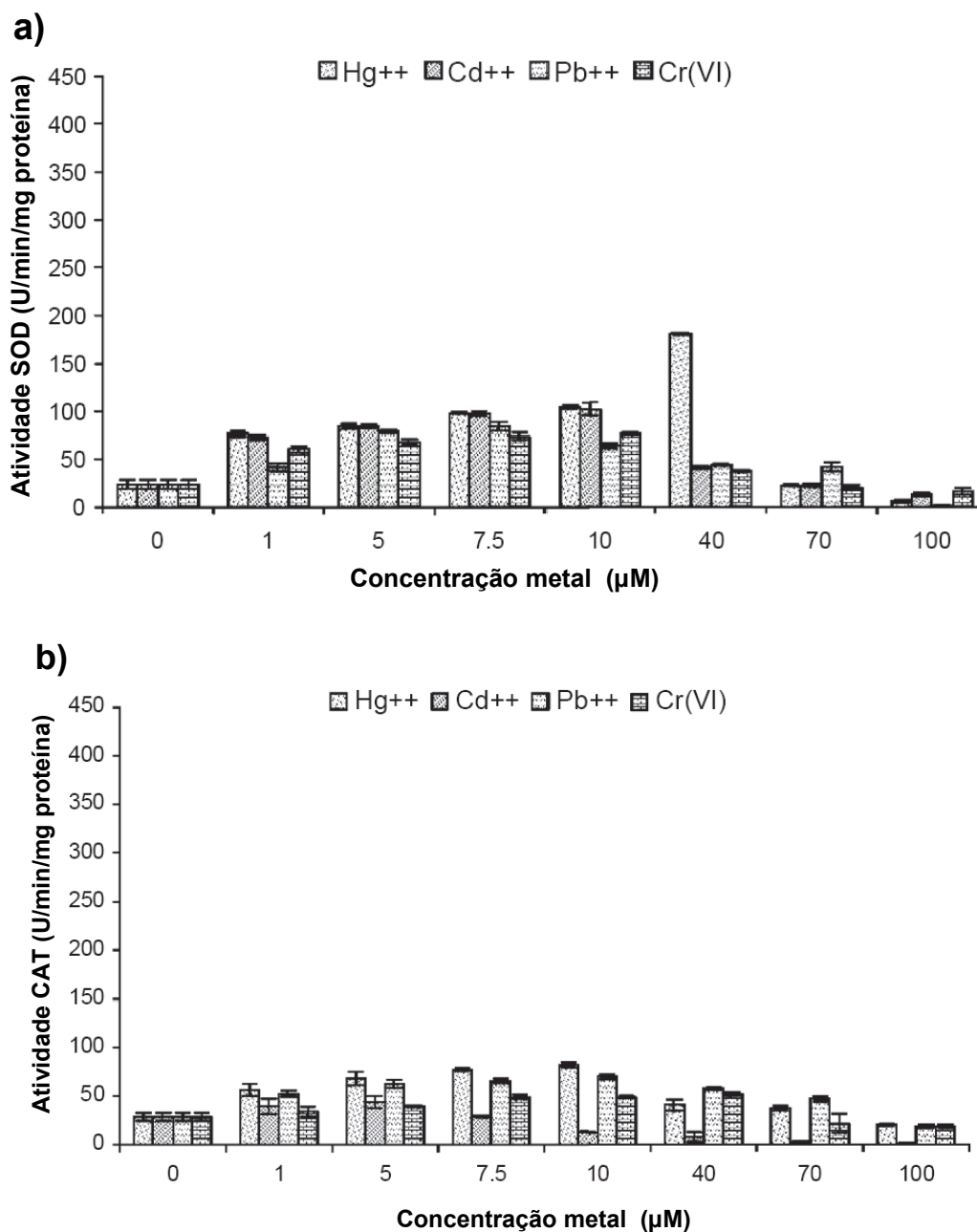


Figura 8. Atividade da a) SOD e b) CAT em *Allium cepa* exposto a diferentes concentrações dos metais Hg, Cd, Pb e Cr. [Retirado de Fatima, R.A.; Ahmad, M.; *Sci. Total Environ.* 2005, 346, 256.]

No mesmo trabalho Fatima e Ahmad²⁷ estudaram a atividade destas enzimas antioxidantes de *Allium cepa* em amostras de água coletadas em um parque industrial. Estas amostras de água foram submetidas a uma análise utilizando espectrometria de absorção atômica, e foi detectado grandes quantidades de metais como Hg, Cd, Cu, Cr, Pb e Zn. Na Figura 9 observa-se que a atividade da CAT na solução diluída da amostra de água, não apresentou um aumento significativo se comparado com o controle, porém sua atividade sofreu uma redução nas soluções mais concentradas. A amostra de água não diluída reduziu a atividade da SOD a zero e em solução mais diluída a SOD apresentou um aumento da atividade. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a redução ou o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, que leva ao estresse oxidativo, depende do íon metálico e de sua concentração.

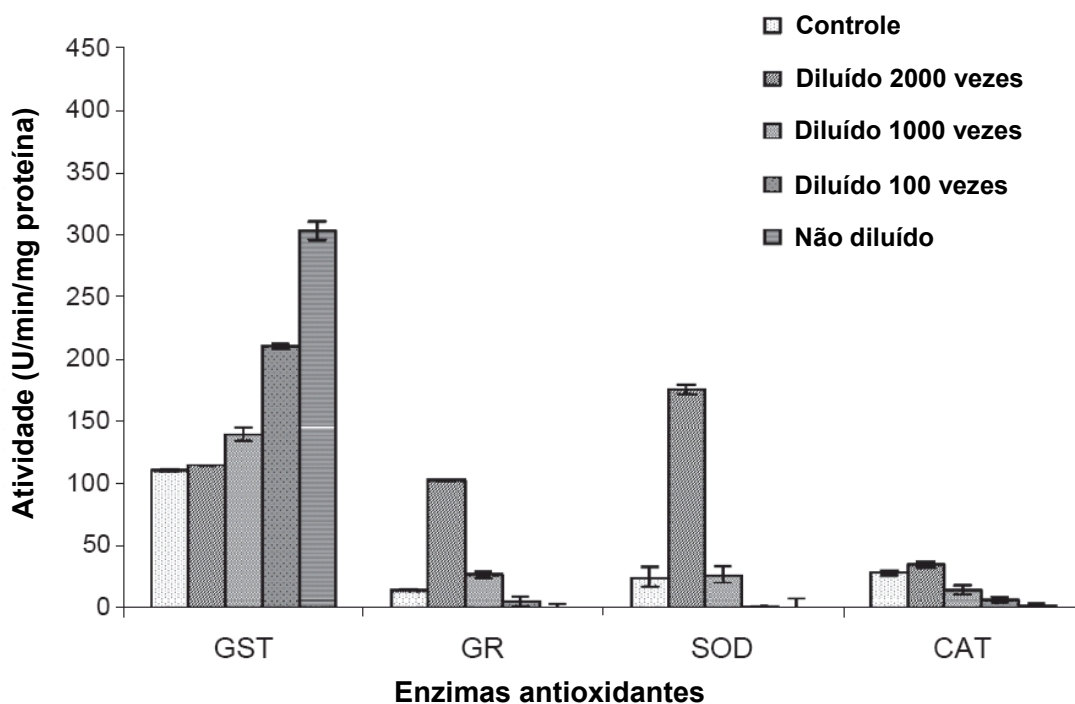


Figura 9. Atividade das enzimas antioxidantes de *Allium cepa* exposta a diluições consecutivas das amostras de água coletadas em um parque industrial. [Retirado de Fatima, R.A.; Ahmad, M.; *Sci. Total Environ.* **2005**, *346*, 256.]

Schützendübel e colaboradores²⁸ observaram que, após 48 horas de exposição à cádmio, plantas da espécie *Populus × canescens* apresentaram inibição de cerca 50 – 75 % da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Figura 10), o que implica no aumento das ERO e conseqüentemente na ocorrência de danos nas células e tecidos das plantas.

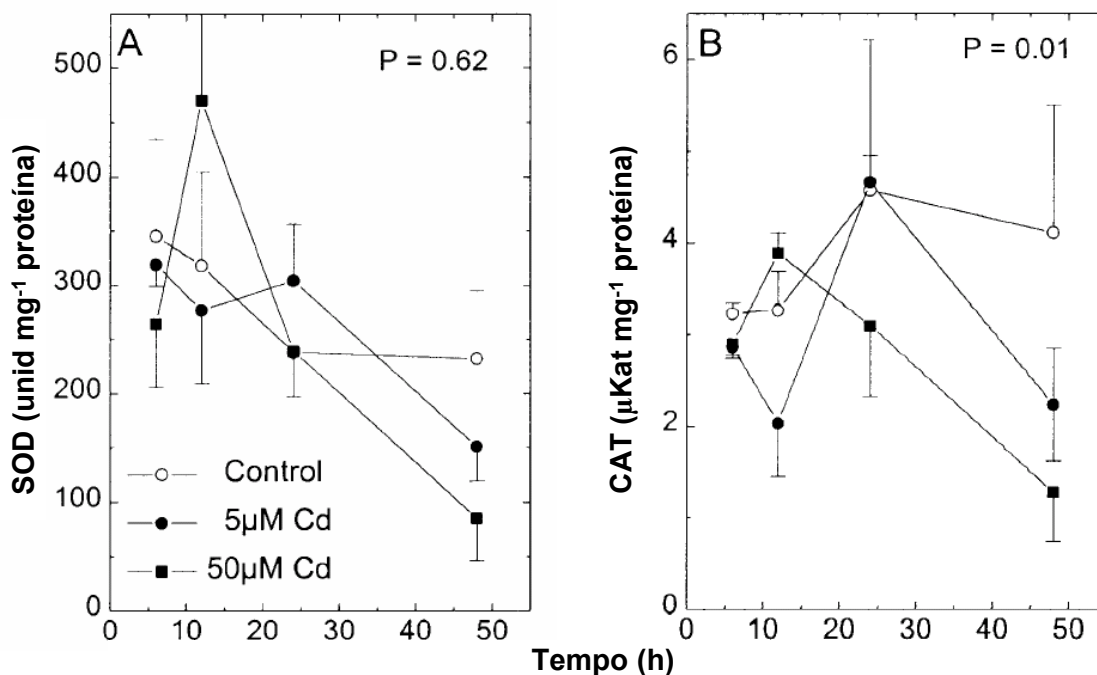


Figura 10. Atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT de *Populus × canescens* expostas a cádmio. [Retirado de Schützendübel, A.; Nikolova, P.; Rudolf, C.; Polle A.; *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 577.]

Huang e colaboradores²⁹ demonstraram que o cádmio reduz a atividade da SOD, e que esta redução está relacionada às mudanças conformacionais provocadas na estrutura da enzima pelo metal. Com a redução da atividade das enzimas antioxidantes, mais ERO estarão presentes no organismo para causar o estresse oxidativo e induzir doenças neurodegenerativas.

Casalino e colaboradores³⁰ avaliaram a atividade da CAT, SOD – Mn e SOD – CuZn de fígado e rim de rato, quando expostas à cádmio, e observaram um efeito negativo na atividade destas enzimas, levando à formação das ERO. Na CAT, este efeito foi relacionado à ligação do cádmio com o grupo imidazol, no resíduo His-74, sendo este resíduo essencial para a decomposição do peróxido de hidrogênio. No caso da SOD – Mn, a redução da sua atividade foi relacionada com a substituição do manganês pelo cádmio. A redução da atividade da SOD – CuZn foi atribuída a mudanças conformacionais em sua estrutura, fator crítico para a sua atividade catalítica.

Ikediobi e colaboradores³¹ também investigaram a resposta da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GR, CAT e GPx) na presença de cádmio, em células de fígado de rato, e observaram uma redução na atividade da enzima catalase (Figura 11). A redução da atividade da CAT foi atribuída à ligação do grupo imidazol do resíduo His-74 (pKa = 6,5), que em meio fisiológico (pH = 7,00) encontra-se desprotonado, ao cádmio levando ao estresse oxidativo.

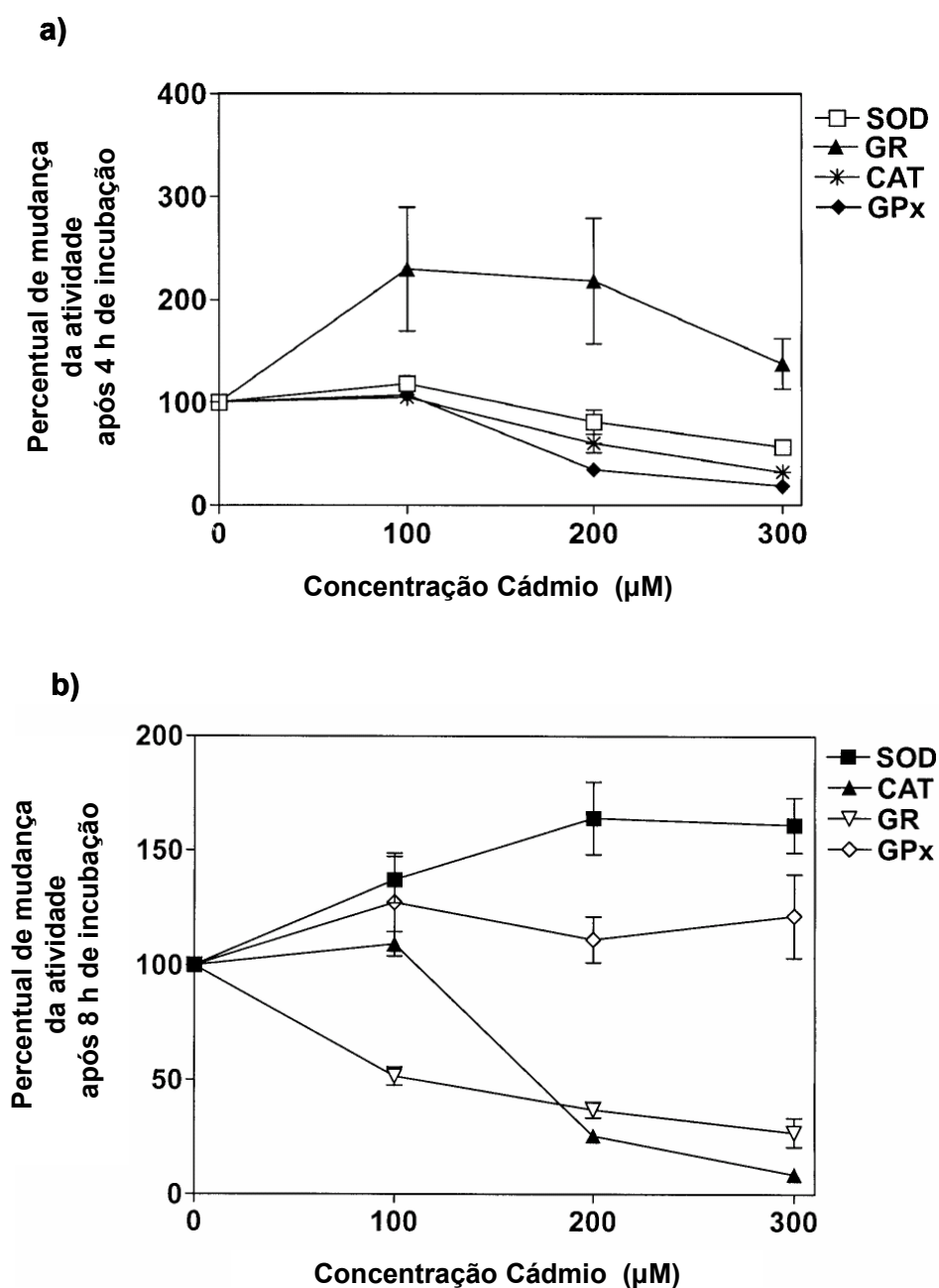


Figura 11. Efeito de CdCl₂ em algumas enzimas antioxidantes em células de fígado de rato em tampão fosfato pH = 7,00 (n=3). a) após 4 h de incubação; b) após 8 h de incubação. [Retirado de Ikediobi, C. O.; Badisa, V. L.; Ayuk-Takem, L.T.; Latinwo, L. M.; West, J.; *Internacional Journal of Molecular Medicine* **2004, 14, 87.]**

No trabalho realizado por Atli e seus colaboradores³² foi verificado primeiramente o efeito do pH na atividade da CAT presente em diferentes tecidos de peixes da espécie *O. niloticus* (Figura 12). Foi observado que em pH 7,00, a atividade relativa da CAT era de 100 % em todos os tecidos. Em seguida, a atividade da CAT nos diversos tecidos foi verificada, em 75 mM de tampão fosfato pH 7,00, na presença dos metais Cd, Zn, Ag, Cr e Cu (Figura 13).

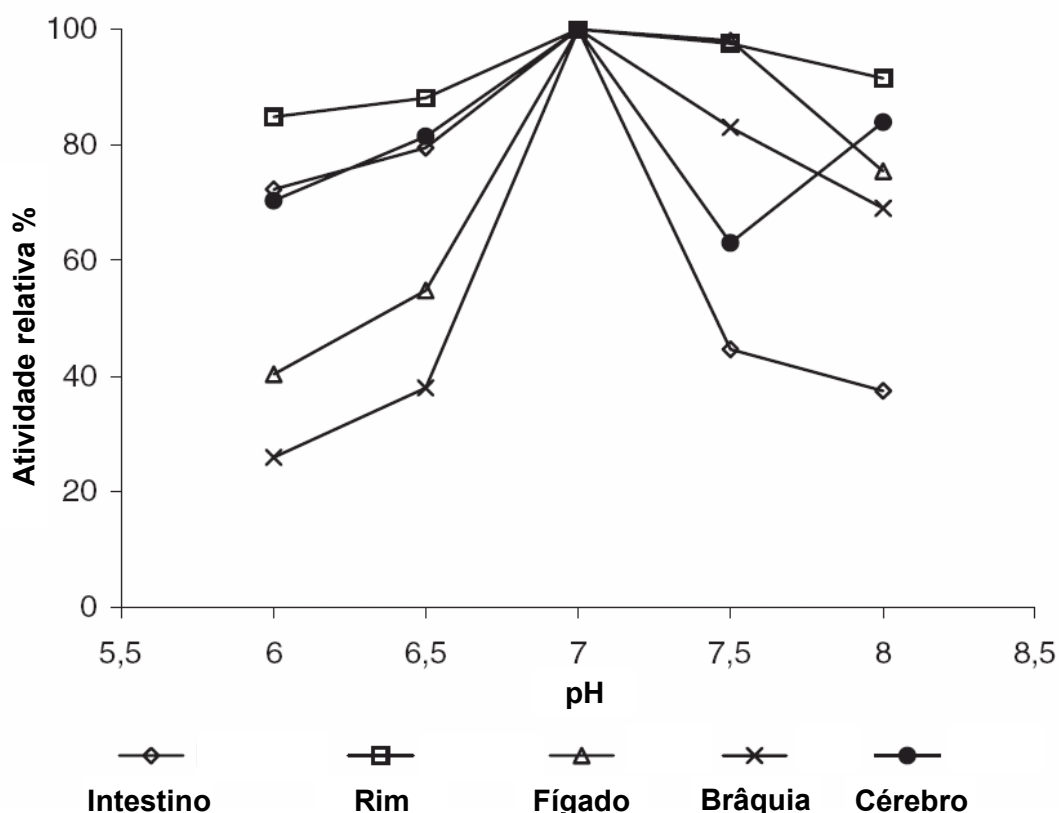


Figura 12. Efeito do pH na atividade da CAT em diferentes tecidos de *O. niloticus*. [Retirado de Atli, G.; Alptekin, O.; Tükel, S.; Canli, M.; *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, *143*, 218.]

Os resultados obtidos por Atli e colaboradores³² foram os seguintes: a) A CAT foi estimulada por todos os metais *in vivo*, exceto a prata; b) Dentro do fígado o aumento mais relevante da atividade da CAT (183%) foi promovido pelo Cd; c) No rim, o cádmio e o zinco não tiveram nenhum efeito significativo na atividade da CAT, considerando que a exposição à Cr causou uma redução de 44%; d) Na brânquia, a exposição à Ag causou um aumento de 66% na atividade da CAT e a exposição à Cr causou uma redução de 97% na atividade da CAT; e) Todos os metais, exceto Cu (41% aumento), causaram reduções significantes na atividade da CAT no intestino; f) No cérebro, o Zn promoveu um aumento na atividade da CAT (126%),

enquanto a exposição à Ag causou uma redução; g) *In vitro*, todos os metais exceto Ag e Cu no rim, inibiram significativamente a atividade da CAT em todos os tecidos; h) A atividade da CAT é dependente dos diferentes tecidos de *O. niloticus* e das concentrações dos metais a que foi exposta (Ag, Cd, Cr, Cu e Zn). A inibição da atividade da CAT, que pode causar o estresse oxidativo, pode estar relacionada diretamente com a ligação dos íons metálicos com o grupo tiol (-SH) presente na molécula da enzima.

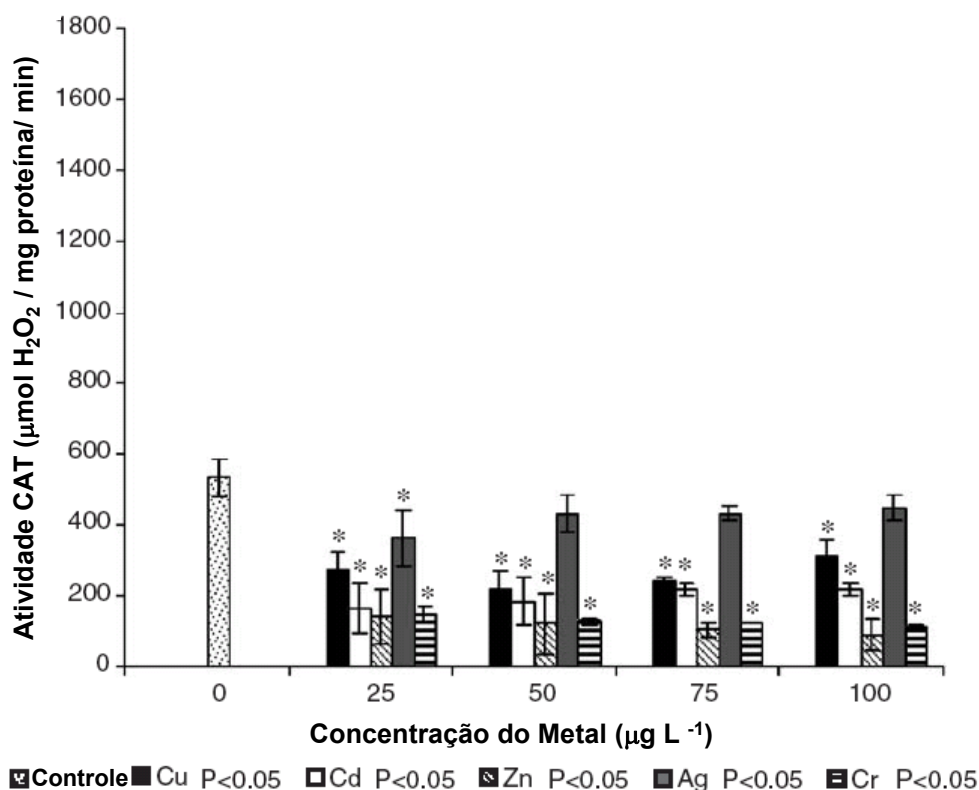


Figura 13. Atividade da CAT em tecido de fígado de *O. niloticus in vitro*. [Retirado de Atli, G.; Alptekin, O.; Tükel, S.; Canli, M.; *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, *143*, 218.]

Os trabalhos realizados até o momento não são conclusivos, em relação ao papel dos íons metálicos na ativação ou inibição da enzima catalase, pois não foram realizados estudos para verificar a complexação da catalase com os íons metálicos, nem obter parâmetros os quantitativos (K_d e estequiometria) dos complexos formados com a enzima e nem identificar os possíveis sítios de ligação de íons metálicos em sua estrutura, sendo estes parâmetros essenciais para uma melhor compreensão do papel dos metais no estresse oxidativo.

2. COMPLEXO PROTEÍNA – METAL E PEPTÍDEO – METAL

Antes de discutir a complexação de íons metálicos com peptídeos e proteínas, serão definidos a seguir alguns termos importantes para uma melhor compreensão do texto.

1) Aminoácidos – consistem em moléculas (Figura 14) que contém um átomo de carbono central ligado a um grupo amino, a um grupo carboxílico, a um átomo de hidrogênio e a um grupo R (cadeia lateral).

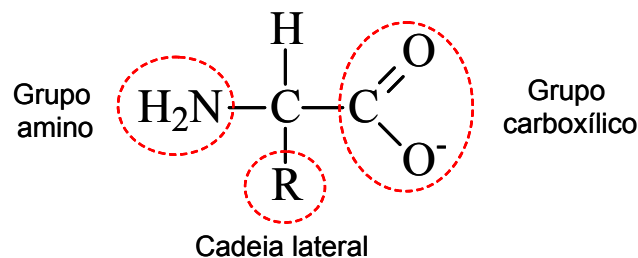


Figura 14. Estrutura geral de um aminoácido.

2) Peptídeos – São biomoléculas que contém dois ou mais aminoácidos unidos por uma ligação peptídica (Figura 15).

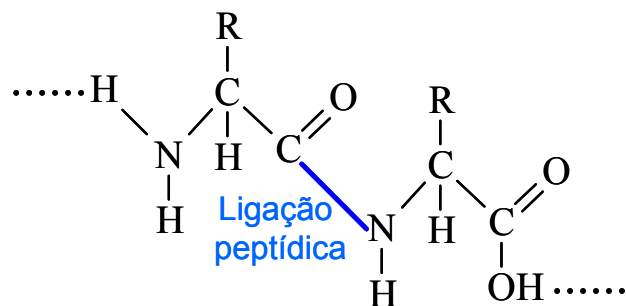


Figura 15. Ligação peptídica.

3) Proteínas – compostos constituídos de uma ou mais cadeias longas de aminoácidos (polipeptídeos), ligados em seqüências características e encontradas em todos os organismos vivos.

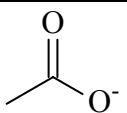
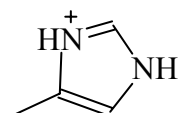

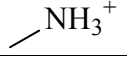
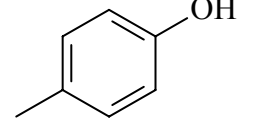
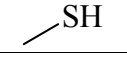
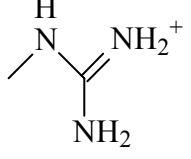
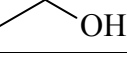
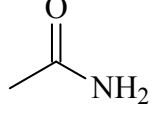
A seguir serão discutidos alguns aspectos importantes da complexação de íons metálicos com peptídeos e proteínas.

2.1 Interação de íons metálicos com peptídeos

Cada um dos aminoácidos naturais é capaz de formar um anel quelato estável de cinco membros com um átomo metálico. Na estrutura geral de um aminoácido (Figura 14) existem dois átomos doadores de pares de elétrons (N e O) separados por três ligações. Alguns aminoácidos possuem ainda doadores de elétrons na cadeia lateral (R), que participam da formação do complexo e podem até competir com os grupos α - amino e com a carbonila da cadeia principal.³³

As principais cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos estão listadas na Tabela 2. Em torno de 65% dos vários tipos de cadeias laterais dos aminoácidos são grupos que permitem uma associação a íons metálicos, em adição a eles estão os grupos carbonila e amino da cadeia principal.

Tabela 2. Cadeias laterais de aminoácidos que interagem com íons metálicos

Cadeia lateral	Estrutura	pK _a aproximado
Carboxila		4
Imidazol		6
α - Amônio		6 - 8
ϵ - Amônio		10
Fenólico		10
Tiol		10
Guanidino		12
Hidroxila		≥ 14
Amida		≥ 14

[Retirado de Chow, E.; Gooding, J.J.; *Electroanalysis* **2006**, *15*, 1437.]

Nos peptídeos simples que possuem cadeias laterais que não interagem com íons metálicos, a ligação com o metal pode ocorrer envolvendo o grupo amino e o oxigênio da amida ou o grupo amino e o nitrogênio da amida (Figura 16). A complexação envolvendo o grupo amino e o nitrogênio da amida também permite o envolvimento do oxigênio da carboxila, produzindo um complexo mais estável (à direita na Figura 16). Para ocorrer a coordenação do metal pelo nitrogênio da amida, é necessária a substituição da ligação N – H pela ligação N – M²⁺, conseqüentemente os íons hidrogênio competem com o íon metálico pelo ligante, tornando a complexação do metal pelo peptídeo dependente do pH.^{34,35} A habilidade do íon metálico para provocar a desprotonação do nitrogênio da amida possui um papel fundamental na estabilidade final do complexo, pois esta desprotonação aumenta o número de sítios de coordenação entre o metal e o ligante.³⁶

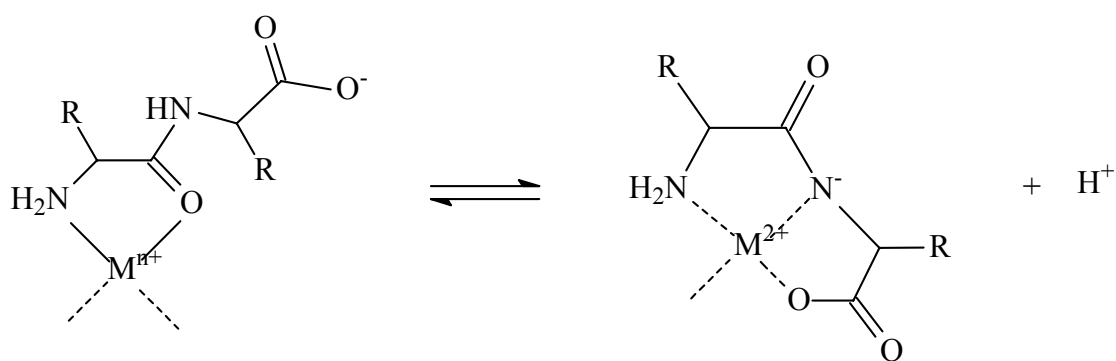


Figura 16. Complexação do íon metálico com um dipeptídeo com cadeias laterais não complexantes. [Retirado de Chow, E.; Gooding, J.J.; *Electroanalysis* 2006, 15, 1437.]

Para peptídeos maiores (três, quatro ou mais resíduos de aminoácidos) observa-se uma ligação significativamente mais forte do metal com cada nitrogênio da amida ao longo do esqueleto peptídico envolvido na coordenação. Esta ligação pode ser ilustrada com o tripeptídeo Gly-Gly-His, no qual a coordenação do Cu²⁺ envolve a desprotonação sucessiva dos nitrogênios da amida e do nitrogênio do imidazol em pH 9-10, resultando na formação de um complexo tetradentado estável (Figura 17). Por outro lado, a complexação dos íons Cd²⁺ por poli-L-cisteína é independente do pH no intervalo de 1,0-7,0, devido o grupo tiol da cadeia lateral da cisteína possuir um valor de pK_a alto (Tabela 2).^{36,37}

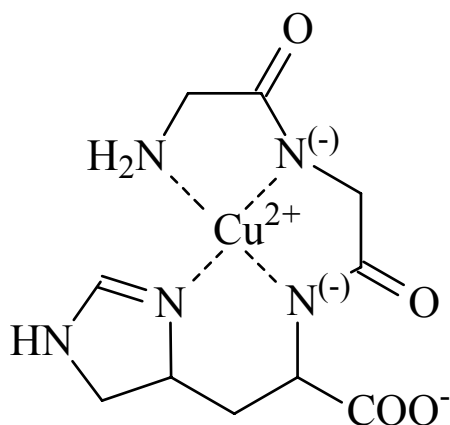


Figura 17. Complexação do íon Cu^{2+} com o tripeptídeo Gly-Gly-His.
 [Retirado de Chow, E.; Gooding, J.J.; *Electroanalysis* **2006**, *15*, 1437.]

Diversos fatores influenciam a afinidade do ligante por diferentes metais. Estes fatores incluem a dureza/moleza do metal, a geometria de coordenação do complexo, efeito de estabilização do campo ligante e a dureza/moleza de alguns sítios de coordenação da seqüência de aminoácidos (peptídeos).

A predição da complexação de uma ligante com um metal pode ser feita tomando como base a classificação dos metais como duros, moles ou intermediários. Os metais duros (K^+ , Li^+ , Na^+ , Ba^+ , Ca^+ , Mg^+ e Al^{3+}) são não polarizáveis, altamente estáveis e formam complexos via ligação eletrostática. A afinidade desses metais pelo ligante decresce na seguinte ordem $\text{O} > \text{P} > \text{N} > \text{S}$. Portanto, estes metais se ligam preferencialmente ao carboxilato encontrado nos peptídeos e aminoácidos e a grupos fosfato no DNA. Para os metais moles (Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Au^+) ocorre uma inversão na preferência de ligação com os ligantes ($\text{S} > \text{N} > \text{P} > \text{O}$). Os metais moles são tóxicos, portanto não essenciais para sistemas biológicos. Aminoácidos com nitrogênio nas cadeias laterais (histidina, lisina e arginina) e com enxofre (cisteína) se ligam preferencialmente à metais moles. Metais que possuem características intermediárias entre duro e mole são conhecidos como metais intermediários. Nesta classe estão incluídos o Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} e o Zn^{2+} . O Cu^{2+} e Pb^{2+} podem ser classificados como metais moles ou intermediários.³⁶

O grupo imidazol da histidina (His) é um sítio muito importante para ligações com zinco, cobre e outros íons, enquanto que a cisteína (Cys) seja talvez o melhor ligante para ligações com metais com alta afinidade pelo enxofre. A ordem

de afinidade dos metais pelo enxofre é: $Hg^{2+} \approx Ag^+ \gg Cu^{2+} > Pb^{2+} \approx Cd^{2+} > Zn^{2+} \gg Ca^{2+} \approx Mg^{2+}$.^{38,39}

A estabilização do campo ligante, a habilidade do metal de desprotonar o nitrogênio da amida, o efeito estérico e a presença de ligantes moles nos aminoácidos das cadeias laterais, todos estes fatores juntos tornam difícil prever precisamente a complexação do ligante com o íon metálico.

A seguir na Tabela 3 serão apresentados alguns exemplos de peptídeos e fragmentos peptídicos que interagem com íons metálicos.

Tabela 3. Peptídeos que interagem com íons metálicos

Peptídeo	Sequência	Metal	Ref.
Fitoquelatinas (Quelante biológico)	$(\gamma - GluCys)_n - Gly$	Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ e As^{3+}	42 - 45
Glutationa (Quelante biológico)	$\gamma - GluCysGly$	Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ e As^{3+}	46 - 48
Oxitocina (Peptídeo hormonal envolvido no ciclo reprodutivo)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys- Pro-Leu-Gly	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}	49,50
Fragmentos peptídicos do Prion (presente no tecido nervoso de mamíferos)	(Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp- Gly-Gln) $_n$ His-Gly-Gly-Gly	Cu^{2+}	51-53

* Outros exemplos de fragmentos peptídicos que interagem com íons metálicos são apresentados na Tabela 16.

2.2 Interação de íons metálicos com proteínas

Ao longo dos sistemas biológicos, as proteínas são encontradas intimamente associadas com cátions metálicos, pois estes possuem um papel importante nos centros catalíticos das metaloenzimas, sendo essenciais para alguns

processos bioquímicos. No entanto, alguns metais como chumbo, cádmio e mercúrio são tóxicos, pois estes interferem na função das metaloenzimas e em outras vias bioquímicas.⁴⁰

Dois grupos de proteínas que associam-se a metais podem ser destacados: as metaloproteínas, onde o metal faz parte da estrutura da proteína e não pode ser removido sem que a mesma não seja destruída e os complexos proteína – metal, onde o metal se liga à proteína reversivelmente.^{33,41}

Na Tabela 4 são apresentados alguns exemplos de proteínas que interagem com íons metálicos e desempenham funções importantes nos organismos vivos.

Tabela 4. Proteínas que interagem com íons metálicos

Proteína	Função	Metal	Ref.
Metalotioneínas	Armazenar os metais tóxicos em uma forma não tóxica e regular o metabolismo do zinco e do cobre celular.	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ e Hg ²⁺	54-57
Zinc Fingers	Participam do controle regulatório da transcrição genética.	Zn ²⁺	58, 59
Albuminas	Transportar hormônios, ácidos graxos, fármacos e íons metálicos	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Ca ²⁺ e Cd ²⁺	60-65
Metaloenzimas	Facilitar uma variedade de reações: hidrólise catalisada por ácido (realizada pelas hidrolases); reações redox (oxidases e oxigenases); e o rearranjo de ligações carbono-carbono (sintases e isomerases)	Zn ²⁺ , Fe ³⁺ ou Cu ²⁺	19, 66- 68

3. VOLTAMETRIA

A voltametria é uma técnica eletroquímica que estuda as relações entre o potencial, a corrente e o tempo, durante a eletrólise da espécie de interesse (analito). Nesta técnica, um potencial variável (sinal de excitação) é aplicado sobre uma célula eletroquímica e uma resposta de corrente, que é proporcional à concentração do analito, se desenvolve em função do sinal de excitação. A voltametria é amplamente utilizada em análises químicas de rotina e de pesquisa.^{69,70}

O aparato para uma análise voltamétrica consiste em três eletrodos (de trabalho, de referência e auxiliar) imersos em uma solução contendo o analito e o eletrólito suporte. O eletrodo de trabalho consiste em um eletrodo polarizável que geralmente é um metal como mercúrio, platina ou ouro, mas também pode ser de carbono vítreo. O eletrodo de referência pode ser o eletrodo de calomelano saturado ou o eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar geralmente é de platina. O potencial é aplicado entre os eletrodos em forma de varredura, e a curva obtida de corrente versus a diferença de potencial gerada entre eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência é chamado de voltamograma.

O eletrodo de mercúrio é amplamente utilizado em voltametria, pois possui um intervalo de potencial negativo relativamente amplo, até -1,8 V vs SCE, que se deve a sobrevoltagem para a redução do íon H^+ na superfície do mercúrio. No entanto, para potenciais positivos, o intervalo é menor, até + 0,25 V vs SCE, devido à oxidação do mercúrio. Para estudos em potenciais positivos é mais apropriado o uso dos eletrodos de platina, de ouro ou de carbono vítreo. Outra vantagem para o uso do eletrodo de mercúrio é o fato de que a superfície do eletrodo é renovada pela produção de uma nova gota, reduzindo os efeitos de contaminação ou de envenenamento da superfície do eletrodo.

3.1 Técnicas Voltamétricas

As diversas técnicas voltamétricas são discutidas a seguir.

3.1.1 Polarografia clássica ou de corrente contínua

Os primeiros estudos voltamétricos foram realizados por Heyrovsky em 1922 usando um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e o sistema Hg^0 (poço de mercúrio/ Hg_2Cl_2) como eletrodo de referência.⁷¹

Quando o eletrodo de trabalho consiste em mercúrio gotejante é utilizado o termo polarografia.⁷² O aparelho utilizado nas análises polarográficas é mostrado a seguir na Figura 18.

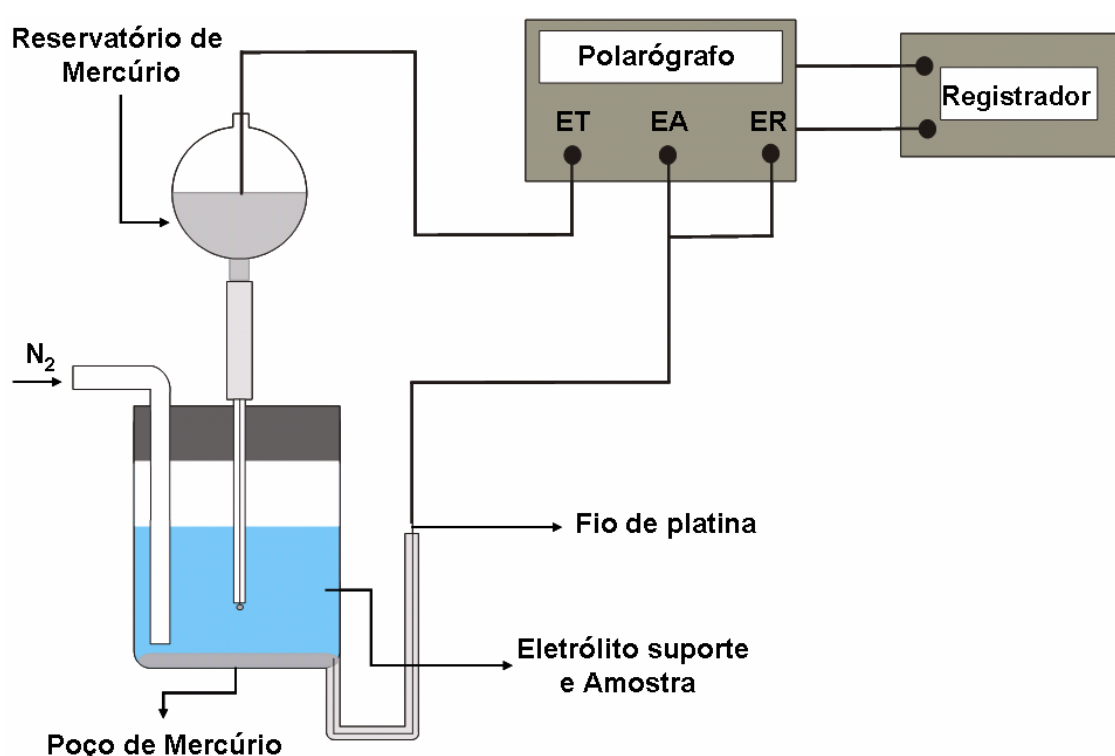


Figura 18. Polarografia: aparelhagem básica.

Em análises polarográficas é necessária a remoção do O_2 atmosférico dissolvido nas soluções, pois o O_2 é eletroativo e produz duas ondas polarográficas na região catódica ($-0,05\text{ V}$ e $-1,00\text{ V}$ vs SCE). A remoção do O_2 é feita por meio do borbulhamento (purga) de um gás inerte (N_2), diretamente na solução por alguns minutos.

Na polarografia clássica é utilizada, como sinal de excitação, uma rampa de potencial linear (Figura 19a), no qual o potencial é varrido de positivo para negativo a uma taxa constante. A corrente é medida continuamente à medida que a gota de mercúrio cresce e então cai, originando um polarograma oscilante (Figura 19b).

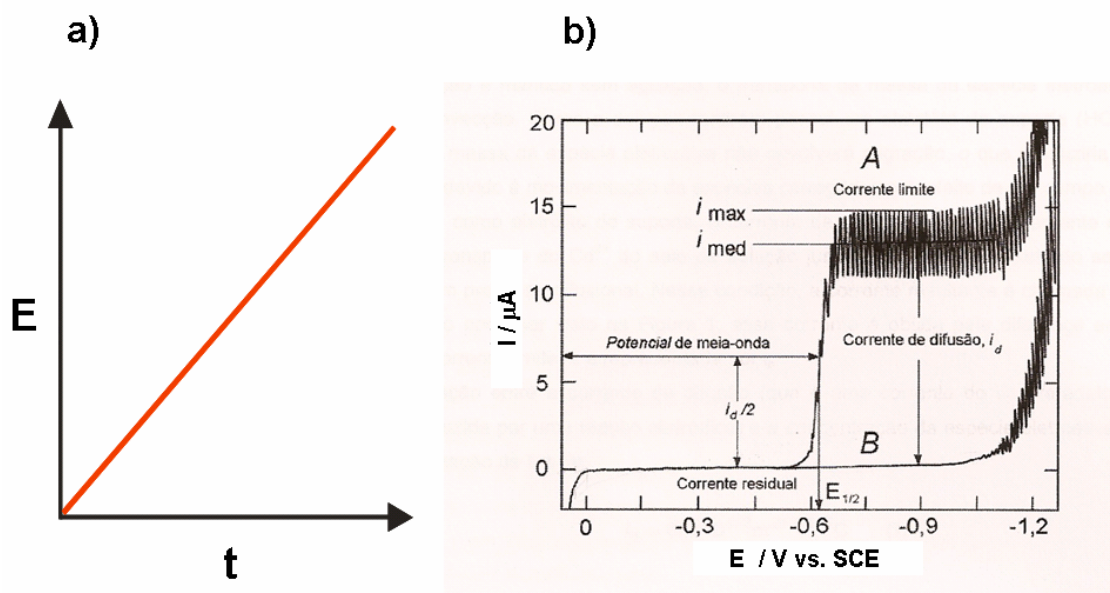


Figura 19. a) Sinal de excitação da polarografia clássica, varredura linear; b) Polarograma característico. [Retirado de Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.]

Do ponto de vista de análise quantitativa, a informação mais importante do polarograma é o fornecimento do valor da corrente de difusão (i_d), pois esta corrente é proporcional à concentração do analito. A difusão é um processo de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo, no qual o movimento de espécies químicas ocorre sob a influência de um gradiente de concentração, ou seja, as substâncias deslocam-se de regiões de concentrações altas para regiões de concentrações baixas.

A relação entre a i_d (corrente do tipo faradaica) e a concentração do analito é dada pela equação de Ilkovic (Equação 9).

$$i_d = 607 nD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (9)$$

onde:

i_d = corrente de difusão (μA);

n = número de elétrons;

D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$);

m = velocidade de fluxo de Hg (mg s^{-1})

t = tempo de gota (s);

C = concentração (mol L^{-1}).

Além da difusão, mais dois processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo podem ocorrer. Um desses processos é a migração, que é provocada pela diferença de potencial que existe entre a superfície do eletrodo e a solução. A corrente originada deste processo pode ser minimizada pela adição de um eletrólito inerte, em uma concentração pelo menos 100 vezes maior que a substância eletroativa. O outro processo é a convecção, no qual o transporte de massa da espécie eletroativa para o eletrodo é através do movimento físico da solução. A corrente de convecção pode ser minimizada mantendo-se a solução sem agitação.

A técnica de corrente contínua é muito limitada do ponto de vista analítico, devido ao seu alto limite de detecção (da ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Esta limitação se deve principalmente a corrente capacitiva (não faradaica), que é uma das componentes da corrente residual mostrada no polarograma da Figura 19b. Essa corrente é proveniente de fenômenos relacionados à dupla camada elétrica, que possui comportamento semelhante ao de um capacitor (interface eletrodo/ eletrólito suporte).

3.1.2 Voltametria de pulsos

A melhoria instrumental na diferenciação entre a corrente faradaica e a corrente capacitiva, viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. A instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial fossem realizados em intervalos de tempo muito pequenos durante o tempo de vida de uma gota.⁷³

As técnicas de pulso se baseiam na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A corrente medida está relacionada com a largura do pulso e com o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo.⁷⁴ A diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que caracteriza as diferentes técnicas de pulso.

3.1.2.1 Voltametria de pulso normal

Na NPV, o DME é mantido em um potencial inicial constante durante a maior parte do tempo de vida da gota, porém nos últimos 50 a 60 ms, um pulso de potencial mais elevado é aplicado à gota. A corrente é medida durante os últimos 20 ms do tempo de vida da gota (Figura 20a). O potencial aplicado a cada gota sucessiva é aumentado gradualmente para dar a varredura de voltagem necessária. A corrente medida no fim da vida da gota é devida essencialmente ao processo de Faraday e é proporcional a concentração do analito. O voltamograma resultante é semelhante a um polarograma DC (Figura 20b).

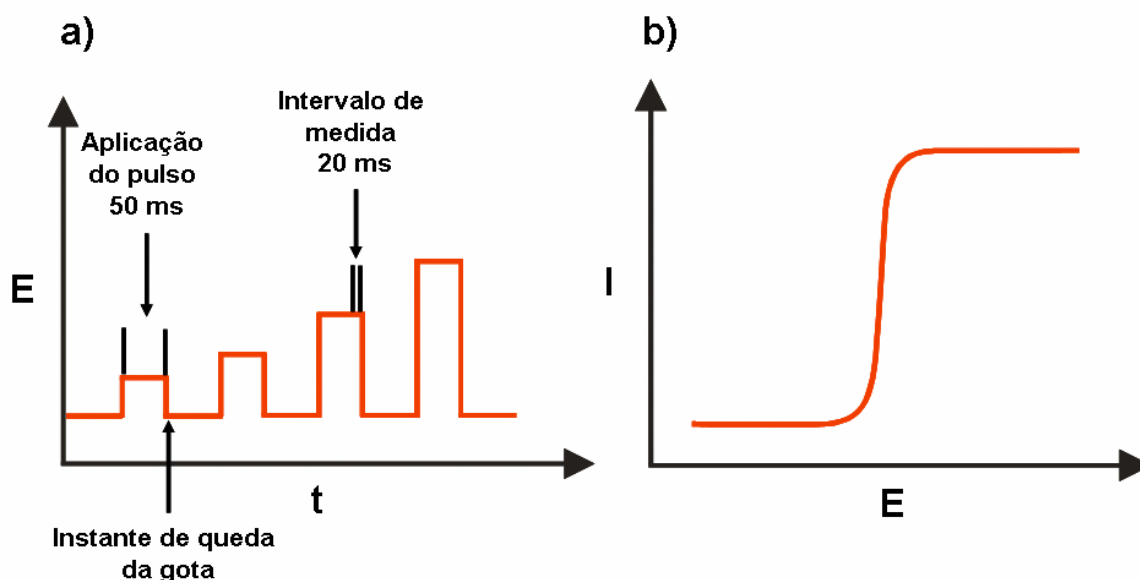


Figura 20. a) Sinal de excitação da voltametria de pulso normal; b) Voltamograma característico da NPV.

3.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial

Na DPV uma série de pulsos de amplitude constantes (10-100 mV) são superpostos a rampa linear de potencial. O pulso é aplicado durante os últimos 50 ms de vida de uma gota, e como mostrado na Figura 21, são realizadas duas medidas de corrente durante o tempo de vida de cada gota, uma (em S_1) que é 16,7 ms antes do pulso e outra (em S_2) 16,7 ms antes do final do pulso. A diferença de corrente (Δi) por pulso é registrada em função do potencial aplicado. O resultado é uma curva diferencial (Figura 22), no qual consiste em um máximo cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito.

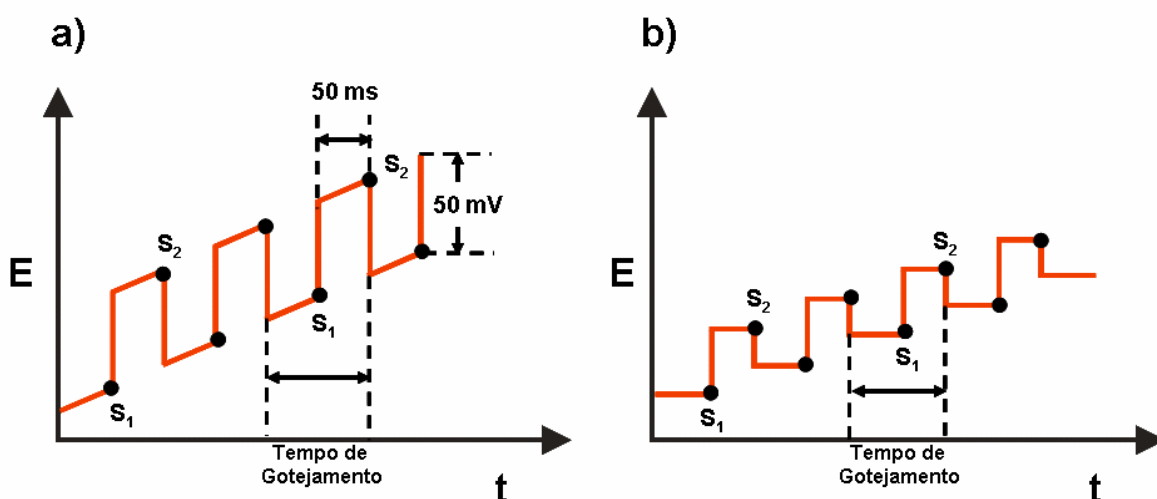


Figura 21. Sinal de excitação da voltametria de pulso diferencial. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.

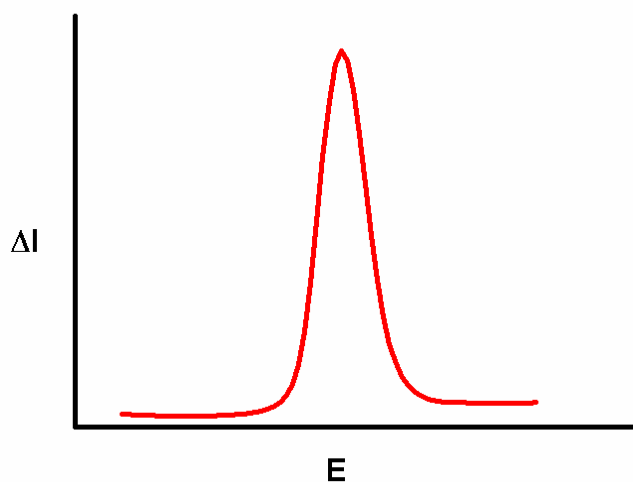


Figura 22. Voltamograma característico da DPV.

Com a utilização da técnica de DP, os limites de detecção são duas ou três ordens de magnitude mais baixos do que os da polarografia clássica, chegando ao intervalo de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. Este aumento da sensibilidade se deve principalmente a uma redução da corrente capacitiva.

3.1.2.3 Voltametria de onda quadrada

A SWV é um tipo de voltametria de pulso que tem como vantagem a grande velocidade e a alta sensibilidade, sendo possível obter um voltamograma completo em poucos segundos. Com o DME, a varredura é feita durante os últimos milissegundos de vida de uma única gota. O sinal de excitação da SWV (Figura 23c) é obtido superpondo uma escada de potencial (Figura 23a) sobre a onda quadrada (Figura 23b). A corrente (Δi) é a diferença entre a corrente observada no ponto 1 e a corrente no ponto 2, sendo Δi proporcional à concentração do analito. O voltamograma característico da SWV é mostrado na Figura 24. Como nos métodos de pulso, o limite de detecção desta técnica é da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹.

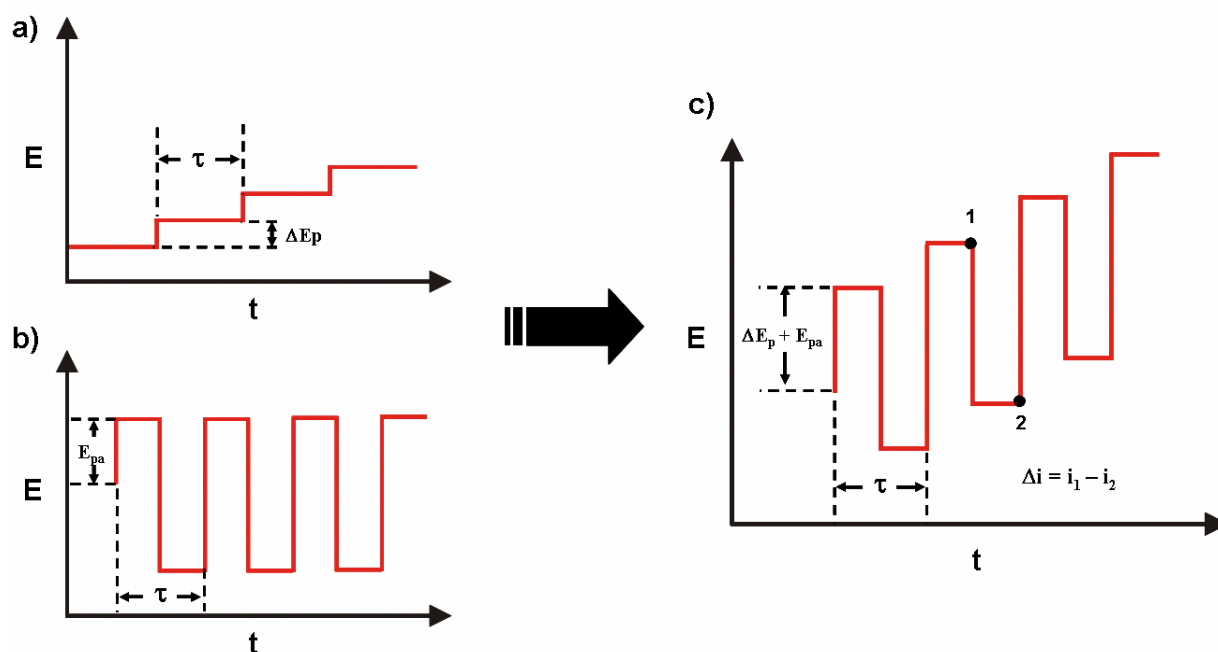


Figura 23. a) Escada de potencial; b) Onda quadrada c) Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada.

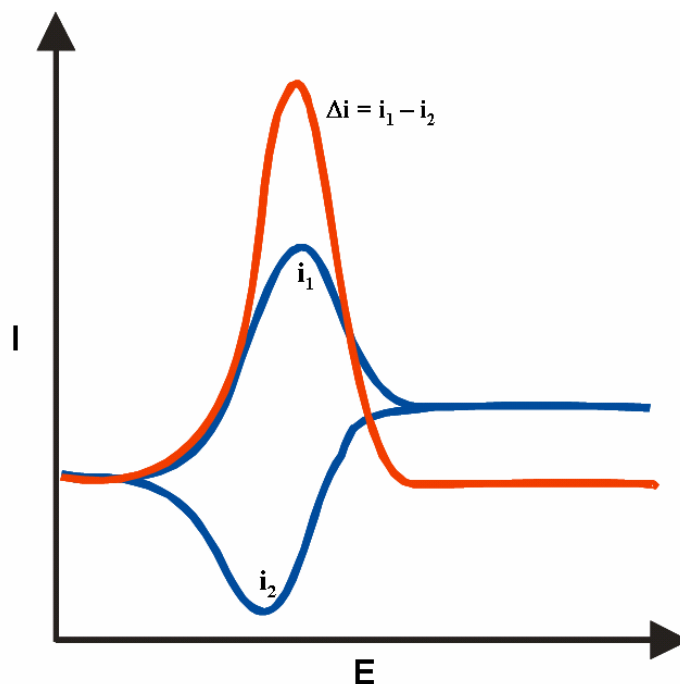


Figura 24. Voltamograma característico da SWV.

3.1.3 Voltametria de redissolução

As técnicas de redissolução se baseiam na deposição do analito em um eletrodo sob agitação. Depois de um tempo medido com precisão, a etapa de deposição é interrompida, cessa-se a agitação e o analito é determinado por meio de um dos métodos voltamétricos descritos anteriormente.

Na ASV o eletrodo comporta-se como o cátodo durante a etapa de deposição e como ânodo durante a etapa de redissolução (oxidação do analito depositado na superfície do eletrodo). Na técnica de redissolução catódica, o eletrodo comporta-se como o ânodo durante a etapa de deposição e como cátodo durante a etapa de redissolução. O eletrodo mais utilizado em métodos de redissolução é o HMDE.

A etapa de deposição corresponde a uma pré-concentração eletroquímica do analito, e devido a esta etapa os métodos de redissolução produzem limites de detecção muito mais baixos, da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹, do que os demais métodos voltamétricos.

A Figura 25 ilustra o programa de excitação de potencial utilizado na técnica de redissolução anódica para a determinação do íon metálico (M²⁺) em

solução aquosa. Inicialmente é aplicado ao eletrodo um potencial catódico constante (E_d), que provoca a redução do M^{2+} sob agitação. O eletrodo é mantido nesse potencial por um determinado tempo (t_d), para que uma quantidade significativa do metal se acumule no eletrodo. Em seguida, a agitação é interrompida por alguns segundos (tempo de equilíbrio), enquanto o eletrodo ainda é mantido no E_d . Após a etapa de deposição, o potencial é reduzido linearmente para valores menos negativos e a corrente da célula é registrada em função do potencial.

Normalmente apenas uma fração do analito é depositada durante a etapa de deposição, portanto, o resultado quantitativo depende do controle do potencial do eletrodo, do tempo de deposição e da velocidade de agitação da amostra. O voltamograma característico da DPASV é mostrado na Figura 26.

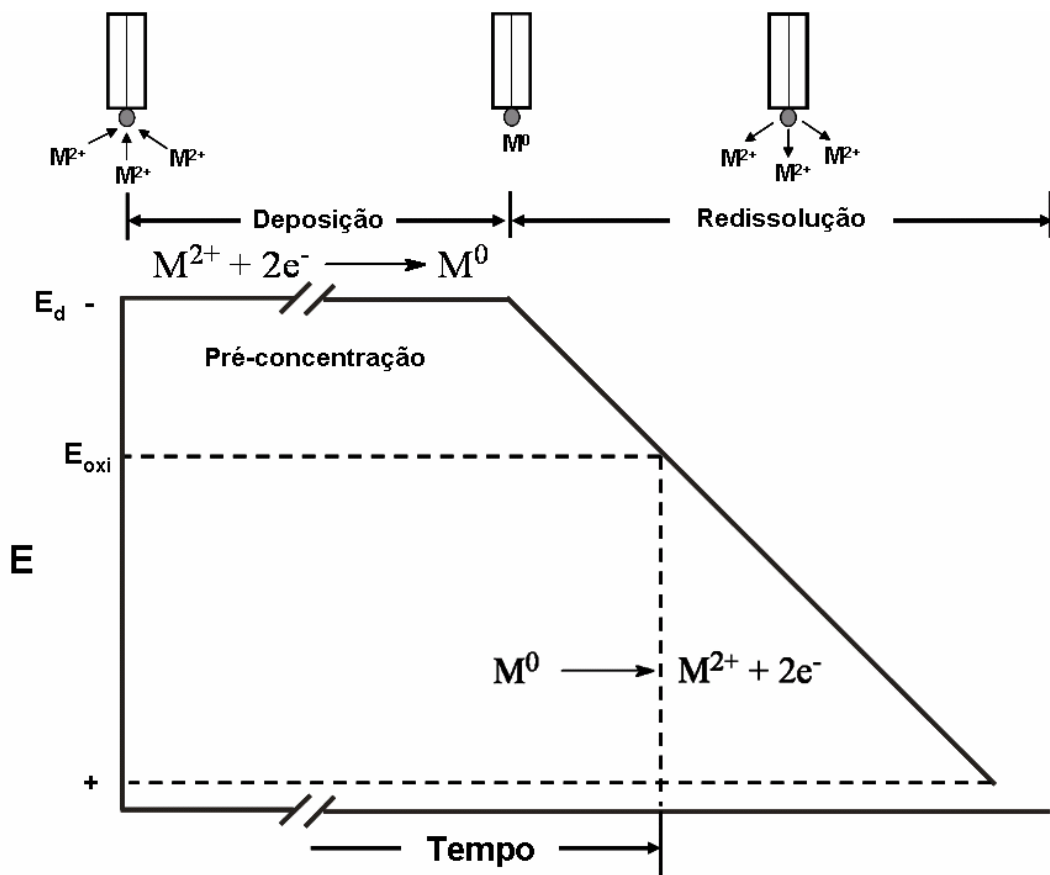


Figura 25. Sinal de excitação para a determinação do M^{2+} por redissolução anódica. E_d = potencial de deposição; E_{oxi} = potencial de oxidação do M^{2+} .

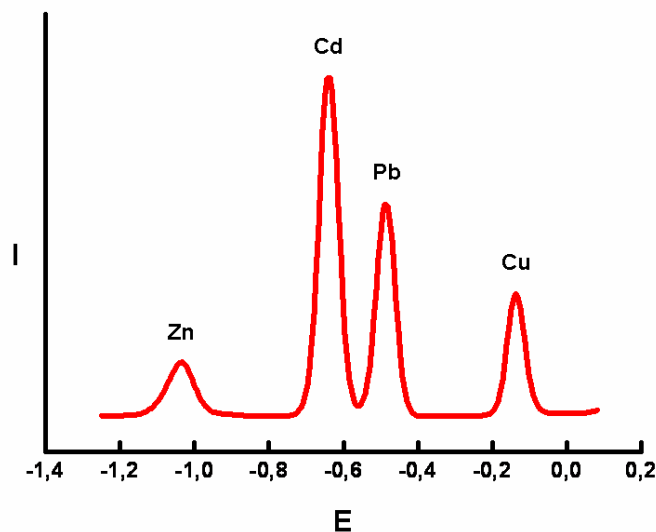


Figura 26. Voltamograma DPASV do zinco, cádmio, chumbo e do cobre.

3.1.3.1 Técnicas de redissolução adsorptivas

As técnicas de redissolução adsorptivas são similares às técnicas de redissolução anódica e catódica. A etapa de pré-concentração é feita por adsorção física do analito na superfície do eletrodo sob agitação, sendo geralmente o HMDE o eletrodo utilizado. Em seguida, a agitação é interrompida e o analito depositado é determinado pelas técnicas voltamétricas de pulso ou de varredura linear. Esta técnica é aplicada em um número ilimitado de moléculas orgânicas, que podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo, e o limite de detecção pode chegar à ordem de 10^{-11} a 10^{-12} mol L⁻¹.

3.1.4 Voltametria cíclica

A CV utiliza ondas triangulares (Figura 27) como sinais de excitação para o eletrodo de trabalho. O primeiro (Figura 27a), que é usado em equipamentos analógicos, é uma rampa de potencial linear. O segundo (Figura 27b), que é usado em equipamentos digitais, é uma rampa de potencial na forma de escada. Após aplicar uma rampa de potencial entre os tempos t_0 e t_1 , a rampa é invertida para trazer o potencial ao seu valor inicial no tempo t_2 . Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O ciclo pode ser repetido diversas vezes.

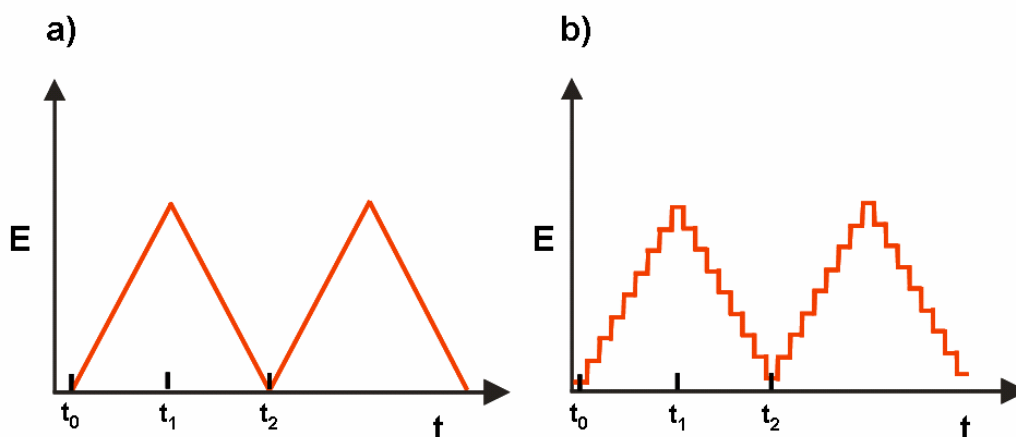


Figura 27. Sinal de excitação para a CV. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.

A Figura 28 mostra o voltamograma característico da voltametria cíclica. O início da curva de potencial versus corrente, começando em t_0 , assemelha-se aos voltamogramas normais com uma onda catódica. Em seguida a corrente diminui à medida que o potencial aumenta. Após t_1 , o potencial é invertido, porém a corrente catódica continua a circular por que o potencial ainda é suficientemente negativo para a redução. Quando o potencial se torna suficientemente menos negativo, a espécie eletroativa anteriormente reduzida começa a ser oxidada, originando uma onda anódica. Após a oxidação da espécie eletroativa, a corrente anódica diminui para o seu valor inicial em t_2 .

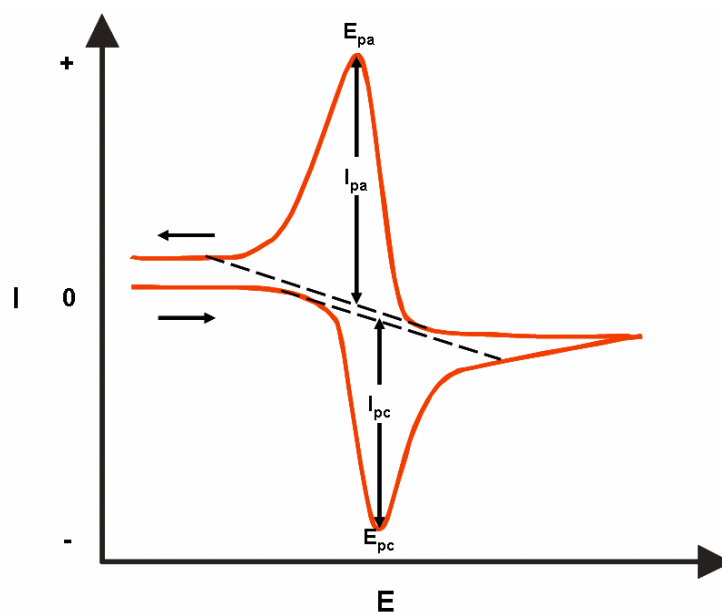


Figura 28. Voltamograma característico da voltametria cíclica.

Os parâmetros importantes em um voltamograma cíclico são: o potencial do pico catódico (E_{pc}); o potencial do pico anódico (E_{pa}); a corrente de pico catódico (I_{pc}); e a corrente de pico anódico (I_{pa}). A Figura 28 ilustra como esses parâmetros são estabelecidos.

A voltametria cíclica fornece essencialmente informações qualitativas extremamente importantes sobre as velocidades e os mecanismos de processos de oxidação/redução, sendo geralmente empregada no estudo de sistemas desconhecidos.

Os voltamogramas característicos para processos redox reversíveis (Equação 10), quasi-reversíveis e irreversíveis são mostrados na Figura 29a, 29b e 29c, respectivamente.

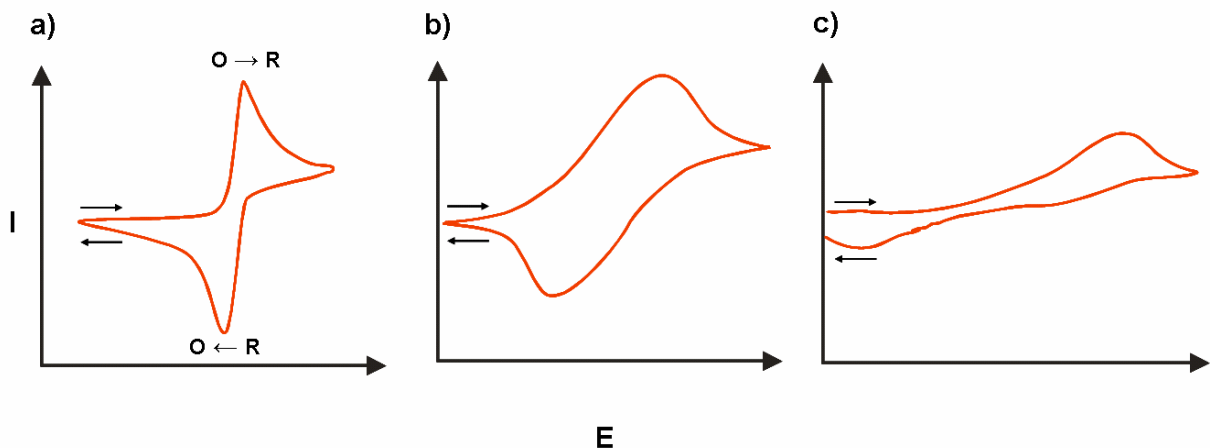


Figura 29. Voltamogramas característicos para processos redox: a) reversíveis; b) quasi - reversíveis; c) irreversíveis.

Para processos reversíveis de eletrodo:

- O potencial de redução padrão é calculado pela seguinte equação.

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (11)$$

- As correntes de picos catódicos e anódicos são aproximadamente iguais em valor absoluto, porém de sinais opostos (Equação 12).

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1 \quad (12)$$

- A diferença entre os potenciais de pico é:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{0,059}{n} \quad (13)$$

onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação.

3.2 Titulação Amperométrica

A voltametria pode ser utilizada para estimar o ponto de equivalência de titulações, porém é necessário que pelo menos um dos participantes ou um dos produtos da reação envolvida seja oxidado ou reduzido no eletrodo.

A corrente em um potencial fixo na região da corrente limite é medida em função do volume adicionado de titulante. Curvas típicas de titulações amperométricas são mostradas na Figura 30. O ponto final da titulação é estimado por extrapolação.

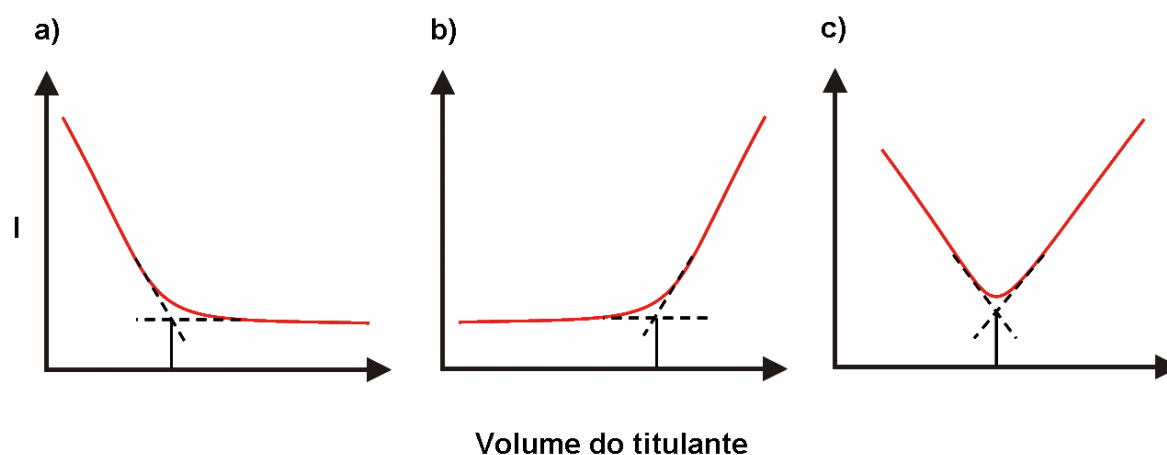


Figura 30. Curvas típicas de titulações amperométricas:

- a) o analito é eletroativo e o titulante não; b) o titulante é eletroativo e o analito não; c) o reagente e o analito são eletroativos.

4. ESTUDOS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS POR VOLTAMETRIA

4.1 Estudos qualitativos

A voltametria vem sendo utilizada como ferramenta de análise para o estudo direto de proteínas desde 1950, no entanto até o final da década de 80, estes estudos eram direcionados para a análise qualitativa de metaloproteínas, ou seja, na caracterização da transferência de elétrons entre o centro redox (metálico) da proteína e o eletrodo. A Tabela 5 mostra um resumo dos estudos voltamétricos qualitativos de proteínas.

Tabela 5. Utilização da voltametria no estudo qualitativo de proteínas

Proteína	Estudo	Técnica	Ref.
Citocromo c ₃ (Bactéria redutora de sulfato)	Investigação da capacidade da proteína em transportar elétrons em baixo potencial por meio do sistema $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$	NPV DPV CV	80-82
Citocromo c (Mitocôndria de cavalo)	Uso do 4,4 – biperidil como modificador de superfície de eletrodo de ouro – transferência de elétrons entre a proteína e o eletrodo	CV	83,84
Citocromo c peroxidase (catalisa a redução de H ₂ O ₂)	Investigação da redução de aminoglicosídeos via eletroquímica direta da enzima, para testes de interferências	DC	85
Citocromo P450C9 (humano)	Caracterização eletroquímica por meio do sistema $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$	CV	86
Plastocianina (membrana tilacóide, do cloroplasto de plantas)	Estudo da capacidade da proteína em transportar elétrons por meio do sistema $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^+$	CV	87

Tabela 5. Utilização da voltametria no estudo qualitativo de proteínas (continuação)

Proteína	Estudo	Técnica	Ref.
Ferridoxina I (Azotobacter chroococcum)	Estudo do mecanismo de transporte de elétrons por meio do sistema $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ Para verificação da atividade enzimática	CV	88
Azurina	Estudo da capacidade da proteína em transportar elétrons por meio do sistema $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^+$	CV	89-92

[Retirado de Filho, W.O.P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 2006.]

4.2 Estudos quantitativos

As diversas vantagens que as técnicas voltamétricas oferecem atualmente (técnica não-destrutiva, excelente sensibilidade, tempo de análise curto, determinação simultânea de vários analitos por meio de uma simples varredura, uma teoria desenvolvida e por conseqüência a habilidade de estimar de forma precisa os valores de parâmetros desconhecidos),⁹³ tornaram-nas uma excelente ferramenta analítica, a partir da década de 90, para estudos quantitativos (determinação da estequiometria do complexo e da constante de dissociação) de complexos metálicos com proteínas ou peptídeos. Estes estudos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Utilização da voltametria no estudo quantitativo de proteínas e peptídeos

Proteína/ Peptídeo	Estudo	Técnica	Ref.
Albuminas	Estudo das interações metal-proteína: Hg ²⁺ -Ovoalbumina e Hg ²⁺ -BSA	DPV	94
	Zn ²⁺ - BSA	DPASV e CV	95
γ - tionina	Estudo das interações metal-proteína: Ca ²⁺ - γ - tionina SI α 1	DPV	96
Fitoquelatinas	Estudo dos complexos metálicos: Cd ²⁺ - PC; Pb ²⁺ - PC; Zn ²⁺ - PC e Cu ²⁺ - PC	DPV	97-100
Metalotioneína (fragmento peptídico)	Estudo dos complexos metálicos: Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala - Hg ²⁺ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala - Cd ²⁺ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala - Zn	DPV e SQW	101-104
Glutathiona	Estudo da interação dos íons metálicos Zn ²⁺ , Cd ²⁺ e Pb ²⁺ com a GSH	DPV e CV	105-108
Peptídeos do Prion	Estudo da interação dos íons Cu ²⁺ com os seguintes fragmentos peptídicos sintéticos da proteína prion: Ac-PHGGWGQ-NH ₂ ; Ac-GGGTH-NH ₂ ; Ac-VNITKQHTVTTTT-NH ₂	DPASV	109

Atualmente, não se encontra na literatura estudos qualitativos (caracterização da transferência de elétrons entre o centro redox) e quantitativos (K_d e estequiometria de complexos metálicos), realizados com a enzima catalase, utilizando técnicas eletroquímicas. No entanto, a catalase está sendo utilizada na confecção de biossensores para a detecção do peróxido de hidrogênio.

4.2.1 Biossensores a base de catalase

Em diversos trabalhos¹¹⁰⁻¹¹⁴ a catalase é imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho (platina, ouro ou carbono vítreo) e técnicas como a voltametria cíclica e a de pulso diferencial são utilizadas para estudar os aspectos eletroquímicos e cinéticos do eletrodo modificado. Estes biossensores tornaram-se uma importante ferramenta para a detecção do peróxido de hidrogênio em vários campos como: biotecnologia, aplicações médicas, tecnologia de comida, cosméticos e em processos industriais.

IV – EXPERIMENTAL

A parte experimental do trabalho foi dividida em quatro etapas:

1ª Etapa – Experimentos realizados com a catalase: Verificação da pureza por espectrometria de massa, purificação por diálise, padronização por espectroscopia UV-Vis.

2ª Etapa – Estudo teórico sobre os possíveis sítios de ligação dos metais na catalase: Estudo teórico, utilizando cinco softwares, para identificar os possíveis sítios de ligação dos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} na estrutura da catalase.

3ª Etapa – Experimentos para determinar as condições e os parâmetros experimentais ótimos para o estudo voltamétrico dos complexos: Estudo para determinar as condições experimentais (eletrólito suporte, pH, volumes e concentrações das soluções de metais e da enzima e o tempo necessário para os complexos M^{2+} – CAT atingirem o equilíbrio) e os parâmetros experimentais (técnica voltamétrica, tempo de deposição, tempo de equilíbrio, amplitude do pulso, tempo de vida da gota, área da gota, velocidade de varredura, potencial de deposição, potencial inicial, potencial final e potencial de inversão).

4ª Etapa – Experimentos de investigação dos sistemas CAT – íon metálico: Estudo da interação dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} com a CAT utilizando técnicas voltamétricas.

1. MATERIAL

1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Reagentes

Reagentes	Fonte
Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico HPLC	Brucker
Ácido cítrico PA (HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂)	BDH
Ácido Clorídrico PA (HCl)	Merck
Ácido Nítrico PA (HNO ₃)	Quimex
Borato de Sódio/ Bórax PA (Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O)	Grupo Química
Catalase de Fígado Bovino	Sigma
Fosfato de Potássio Monobásico PA (KH ₂ PO ₄)	Isofar
Fosfato de Sódio Dibásico PA (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Vetec
HEPES PA (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma
Hidróxido de Sódio PA (NaOH)	Quimex
Nitrato de Potássio PA (KNO ₃)	Merck
Solução padrão de cádmio 1000 ppm	Merck
Solução padrão de chumbo 1020 ppm	Merck
Solução padrão de cobre 1000 ppm	Merck
Solução padrão de zinco 1002 ppm	Merck
Trizma HCl PA (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl)	Sigma

1.2 Soluções

1. Solução padrão de Catalase $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
2. Solução padrão de Catalase $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
3. Solução de Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 10 mg/mL
4. Solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
5. Solução padrão Zn^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
6. Solução padrão Zn^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
7. Solução padrão Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
8. Solução padrão Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
9. Solução padrão Cd^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
10. Solução padrão Cd^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
11. Solução padrão Pb^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
12. Solução padrão Pb^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
13. Solução de HNO_3 20% (v/v)
14. Solução de HNO_3 5% (v/v)
15. Solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
16. Solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
17. Tampão Borato pH 7,00
Solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$
18. Tampão Fosfato pH 7,00
Solução de KH_2PO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$
Solução de NaOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$
19. Tampão McIlvaine pH 7,00
Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$
Solução de Ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
20. Tampão Trizma HCl pH = 7,00
Solução de Trizma HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
21. Tampão HEPES
Solução de HEPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

1.3 Vidraria

Lavagem:

O procedimento adotado para a lavagem de toda a vidraria utilizada nos experimentos é descrito abaixo:

- ✓ Lavagem com água de torneira;
- ✓ Lavagem com água destilada;
- ✓ Imersão em cuba contendo solução de HNO_3 20% por 24 horas;
- ✓ Imersão em cuba contendo água tri-destilada por 24 horas;
- ✓ Secagem à temperatura ambiente.

1.4 Eletrodo

Lavagem:

O procedimento adotado para a lavagem dos eletrodos após cada análise voltamétrica é descrito abaixo:

- ✓ Lavagem com água tri-destilada;
- ✓ Lavagem com solução de HNO_3 5% (borbulhar por alguns minutos);
- ✓ Lavagem com água tri-destilada.

1.5 Membrana para diálise

- ✓ Membrana diálise (SPECTRA/POR Thomas Scientific USA)
Vol/cm: 3,2 mL
MWCO (Da): 12-14.000
Diâmetro: 20,4 mm
Thomas nº: 3787 – D32

1.6 Equipamentos utilizados na verificação da pureza e na padronização da catalase

- ✓ Espectrômetro de Massa UltraFlex II (BRUCKER) com ionização MALDI e analisadores do tipo TOF.
- ✓ Espectrofotômetro UV-Vis 911-A (GBC) com feixe duplo, lâmpada de deutério e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

1.7 Softwares utilizados no estudo teórico

- ✓ Cutter - software gerador de peptídeos a partir da clivagem da seqüência de resíduos de aminoácidos da catalase com a enzima específica GluC2.
- ✓ Peptide Cutter - software gerador de peptídeos a partir da clivagem da seqüência de resíduos de aminoácidos da catalase com a enzima específica V8-proteinase.
- ✓ Scale Index – software desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa para o cálculo de parâmetros físico-químicos (ponto isoelétrico, massa molecular e momento hidrofóbico - escala CCS).
- ✓ XLSTAT 2006 – software para plotagem de gráfico 3D contendo os parâmetros desejados.
- ✓ RasMol versão 2.7.2.1.1 – software utilizado para localizar os possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura molecular da catalase.

1.8 Aparelhagem utilizada nos experimentos voltamétricos

- ✓ Analisador voltamétrico Metrohm 797;
- ✓ Eletrodo de Trabalho: HMDE;
- ✓ Eletrodo de Referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹);
- ✓ Eletrodo Auxiliar: Eletrodo de platina.

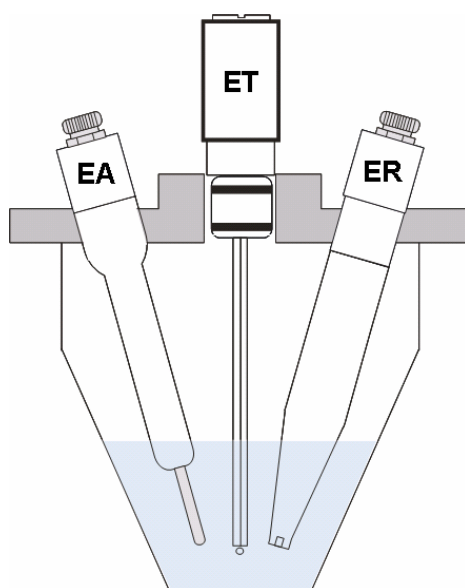


Figura 31. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos voltamétricos.
ET = Eletrodo de Trabalho; ER= Eletrodo de Referência; EA = Eletrodo Auxiliar.

2. METODOLOGIA

2.1 Verificação da pureza da catalase

Foi preparada uma solução com 0,2089g da enzima catalase para um volume de 10 mL de água. A pureza da enzima foi verificada por espectrometria de massa MALDI-TOF utilizando o espectrômetro de massa UltraFlex II (Brucker) e o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. A solução de catalase foi inicialmente misturada em uma solução saturada da matriz na razão 1:3 (2 μ L da amostra para 6 μ L da matriz). Em seguida, a mistura foi depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm (0,5 μ L por spot) e deixada secar a temperatura ambiente. Após a secagem da placa foi realizada a análise no espectrômetro de massa.

2.2 Diálise da solução de catalase

A técnica de diálise foi utilizada para a purificação (remoção dos interferentes: peptídeos, proteínas, moléculas de baixa massa molecular) da catalase. Neste procedimento foi utilizada uma membrana com porosidade de até 14.000 Da e água tri-destilada como solvente. A solução de catalase foi dialisada contra água durante 24 horas a uma temperatura de aproximadamente 4°C. Foram realizadas trocas de água de duas em duas horas e durante a noite não houve troca, totalizando cinco trocas de água durante o procedimento. Após o término da diálise foi verificada a pureza da catalase por espectrometria de massa MALDI-TOF.

2.3 Padronização da solução de catalase

Após a constatação da pureza, a solução de catalase foi padronizada, utilizando a espectroscopia UV-Vis, por meio da medida da absorbância a 280 nm e da lei de Beer. Devido à dificuldade de encontrar com precisão o valor da absorvidade molar (ϵ) da catalase na literatura, o método de Edelhoich¹¹⁵ foi utilizado para o cálculo teórico do ϵ da catalase em 280 nm. Para uma melhor exatidão dos valores de concentração, as absorbâncias também foram medidas a 205, 215 e 225 nm e o método proposto por Murphy e Kies¹¹⁶ também foi utilizado para a padronização da catalase a título de comparação.

Método de Edelhoich para o cálculo da absorvidade molar em 280 nm de peptídeos ou proteínas:

$$\epsilon (280 \text{ nm}) (\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de triptofanos}) (5500) + (\text{n}^\circ \text{ de tirosinas}) (1490) + (\text{n}^\circ \text{ de cistinas}) (125) \quad (14)$$

Lei de Beer:

$$A = \epsilon b c \quad (15)$$

Onde:

A = absorbância da solução de catalase em 280 nm.

ϵ = absorvidade molar calculado pelo método de Edelhoich ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

b = caminho óptico (1 cm).

c = concentração (mol L^{-1}).

Método de Murphy e Kies:

$$(A_{215} - A_{225}) 144 = K \quad (16)$$

$$(A_{205}) 31 = T \quad (17)$$

$$(K + T) / 2 = C \quad (18)$$

Onde:

A = absorvância da solução de catalase em 205, 215 e 225 nm.

C = concentração (mg L⁻¹)

2.4 Estudo teórico sobre os possíveis sítios de ligação de íons metálicos na catalase

A identificação teórica dos prováveis sítios de ligação de íons metálicos (Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺) na enzima catalase foi realizada por meio de dois procedimentos:

1) Construção e utilização de um banco de dados, utilizando informações adquiridas no Swiss-Prot e em artigos científicos, sobre peptídeos descritos que se ligam aos íons Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺.

2) Por meio do software Cutter foi simulada a clivagem da catalase com a enzima específica GluC2 e com o software Peptide Cutter a clivagem com a enzima V8-proteinase. Os parâmetros físico-químicos (ponto isoelétrico, massa molecular e momento hidrofóbico - escala CCS) dos peptídeos foram calculados utilizando o software Scale index (desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa).

Um modelo geral para a clivagem enzimática está representado na Figura 32. Neste modelo foi adotada a nomenclatura criada por Schechter e Berger,^{117,118} onde são designados resíduos de aminoácidos em um substrato que sofre divisão P1, P2, P3, P4 na direção N-terminal da ligação clivada, e igualmente são designados os resíduos na direção C-terminal P1', P2', P3', P4'. A enzima GluC2 cliva em Asp (D) e em Glu (E) na posição P1, enquanto que a enzima V8-proteinase cliva preferencialmente em Glu (E) na posição P1.

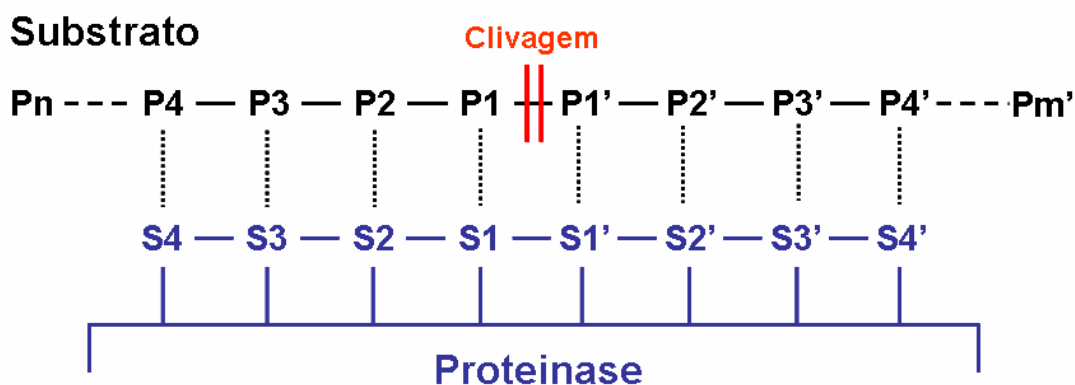


Figura 32. Modelo geral para clivagem enzimática. [Retirado de http://expasy.org/tools/peptidecutter/peptidecutter_enzymes.html#Staph]

Após a simulação da clivagem, verificou-se por meio de plotagem de gráfico tridimensional das características físico-químicas dos peptídeos (ponto isoelétrico, massa molecular e momento hidrofóbico), os agrupamentos entre peptídeos que se ligam aos metais citados na literatura, utilizados como padrões, e os peptídeos obtidos pela clivagem com as enzimas específicas (GluC2 e V8-proteinase). Por comparação com os peptídeos padrões, foram identificados na estrutura da catalase os possíveis peptídeos capazes de se ligar aos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} .

2.5 Determinação das condições e dos parâmetros experimentais ótimos para o estudo voltamétrico da interação dos íons metálicos com a enzima catalase

Foram realizados diversos ensaios para determinar as condições e os parâmetros ótimos para o estudo voltamétrico da interação dos íons metálicos com a catalase. Os itens de 1 a 7 mostram as condições e os parâmetros estudados:

- 1) pH (faixa estudada: 4 a 9);
- 2) Volumes das soluções de metais e da enzima (faixa estudada: 50 a 1000 μ L);
- 3) Concentrações das soluções de metais e da enzima (faixa estudada: 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mol L^{-1});
- 4) Tempo de deposição (faixa estudada: 30 a 180 s)

- 5) Potencial de deposição, potencial inicial, potencial final e potencial de inversão (faixa estudada: -1,25 a 0,2 V).
- 6) Eletrólito suporte (ver 2.5.1)
- 7) Tempo de equilíbrio (ver 2.5.2)

2.5.1 Eletrólito suporte

Para o estudo da interação dos íons metálicos com a enzima catalase por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial, foram realizados inicialmente ensaios com diversos eletrólitos suporte (Figura 33), para verificar em qual meio seria observado o melhor sinal da corrente de oxidação destes metais. A seguir estão listados os eletrólitos utilizados:

- ✓ KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 4,00;
- ✓ KNO_3 0,1 mol L^{-1} pH 7,00 (ajustado com NaOH);
- ✓ Tampão Fosfato pH 7,00;
- ✓ Tampão Borato pH 7,00;
- ✓ Tampão McIlvaine pH 7,00;
- ✓ Trizma HCl pH 7,00;
- ✓ HEPES pH 7,00.

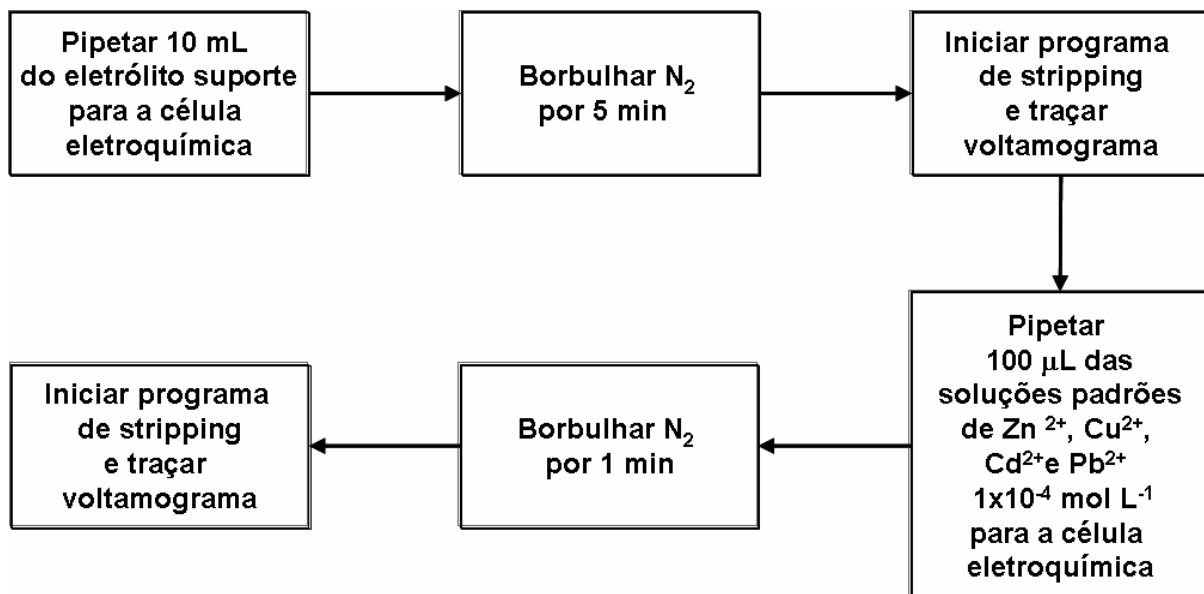


Figura 33. Diagrama esquemático do procedimento adotado nos ensaios com os diversos eletrólitos suporte.

Os parâmetros ótimos utilizados nos ensaios com os diversos eletrólitos suporte são mostrados na Tabela 9.

2.5.2 Tempo de equilíbrio

Foi realizado o estudo do tempo necessário para que o sistema M^{2+} – CAT atingesse o equilíbrio. O procedimento adotado está descrito na Figura 34.

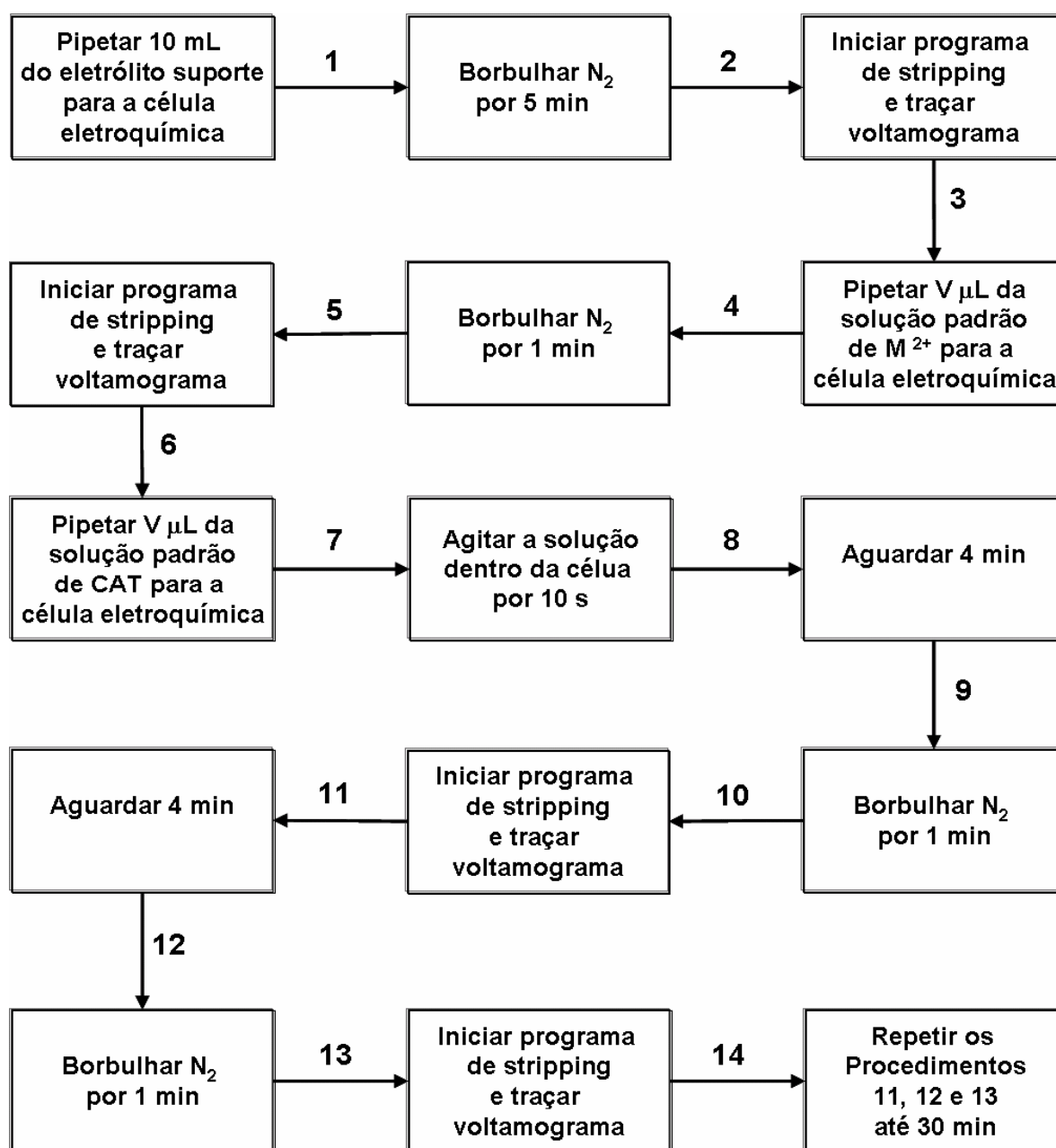


Figura 34. Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo do tempo de equilíbrio. $M^{2+} = Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}$ ou Pb^{2+}

As condições experimentais e os parâmetros ótimos do estudo do tempo de equilíbrio são mostrados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8. Condições experimentais ótimas utilizadas no estudo do tempo de equilíbrio

Condições Experimentais	Zn²⁺	Cu²⁺	Cd²⁺	Pb²⁺
Eletrólito suporte	Tampão borato pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00
[M ²⁺] / mol L ⁻¹	1x 10 ⁻⁴	1x 10 ⁻⁴	1x 10 ⁻⁵	1x 10 ⁻⁵
[CAT] / mol L ⁻¹	5,35x10 ⁻⁶	5,35x10 ⁻⁶	5,35x10 ⁻⁵	5,35x10 ⁻⁵
V _{M²⁺} / μL	100	100	200	200
V _{CAT} / μL	20	20	5	5

2.6 Estudos voltamétricos

2.6.1 Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial

A voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial foi utilizada para estudar a interação da CAT com os íons Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, por meio de uma titulação amperométrica. O procedimento utilizado está descrito na Figura 35.

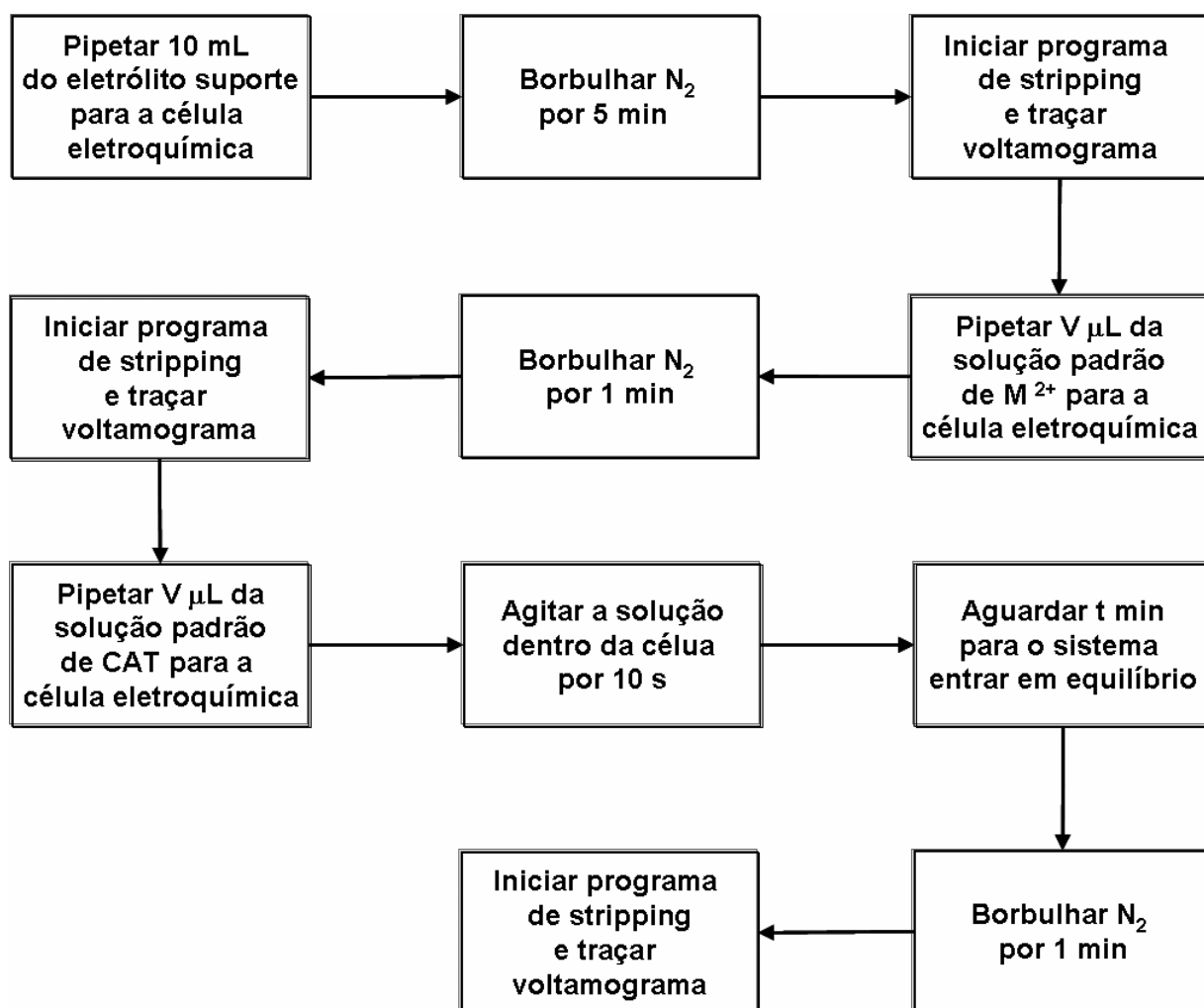


Figura 35. Diagrama esquemático do procedimento adotado na titulação amperométrica do íon M^{2+} com a CAT. $M^{2+} = Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}$ ou Pb^{2+}

Os parâmetros e as condições experimentais ótimos da análise por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial são mostrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9. Parâmetros ótimos utilizados nos ensaios com diversos eletrólitos suporte, no estudo do tempo de equilíbrio e na análise por DPASV

Operações	Parâmetros			
	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺
Tempo de deposição / s	60	60	60	60
Tempo de Equilíbrio / s	20	20	20	20
Amplitude do pulso / mV	50	50	50	50
Tempo de vida da gota / ms	600	600	600	600
Área da gota / mm ²	0,3	0,3	0,3	0,3
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	60	60	60	60
Potencial de deposição e Potencial inicial / V	- 1,15	- 0,25	- 0,75	- 0,70
Potencial Final / V	- 0,75	0,05	- 0,45	- 0,25

Tabela 10. Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por DPASV

Condições Experimentais	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺
Eletrólito suporte	Tampão borato pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00	Tampão Mcllvaine pH 7,00
[M ²⁺] / mol L ⁻¹	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵
[CAT] / mol L ⁻¹	5,35 x 10 ⁻⁶	5,35 x 10 ⁻⁶	5,35 x 10 ⁻⁵	5,35 x 10 ⁻⁵
V _{M²⁺} / μL	100	100	200	200
V _{CAT} / μL	20	20	5	5
Nº de adições de CAT	8	8	6	6
t _{equilíbrio} / min	10	15	15	15

t_{equilíbrio} é o tempo necessário para o complexo M²⁺- CAT estabilizar.

2.6.2 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica, com varredura de potencial na forma de escada, foi utilizada para estudar a interação da CAT com os íons Zn²⁺ e Cu²⁺, por meio de uma titulação amperométrica, e estudar o processo de oxidação/redução do íon metálico

na ausência e na presença da CAT, variando a velocidade de varredura. Os procedimentos utilizados na CV estão descritos nas Figuras 36 e 37.

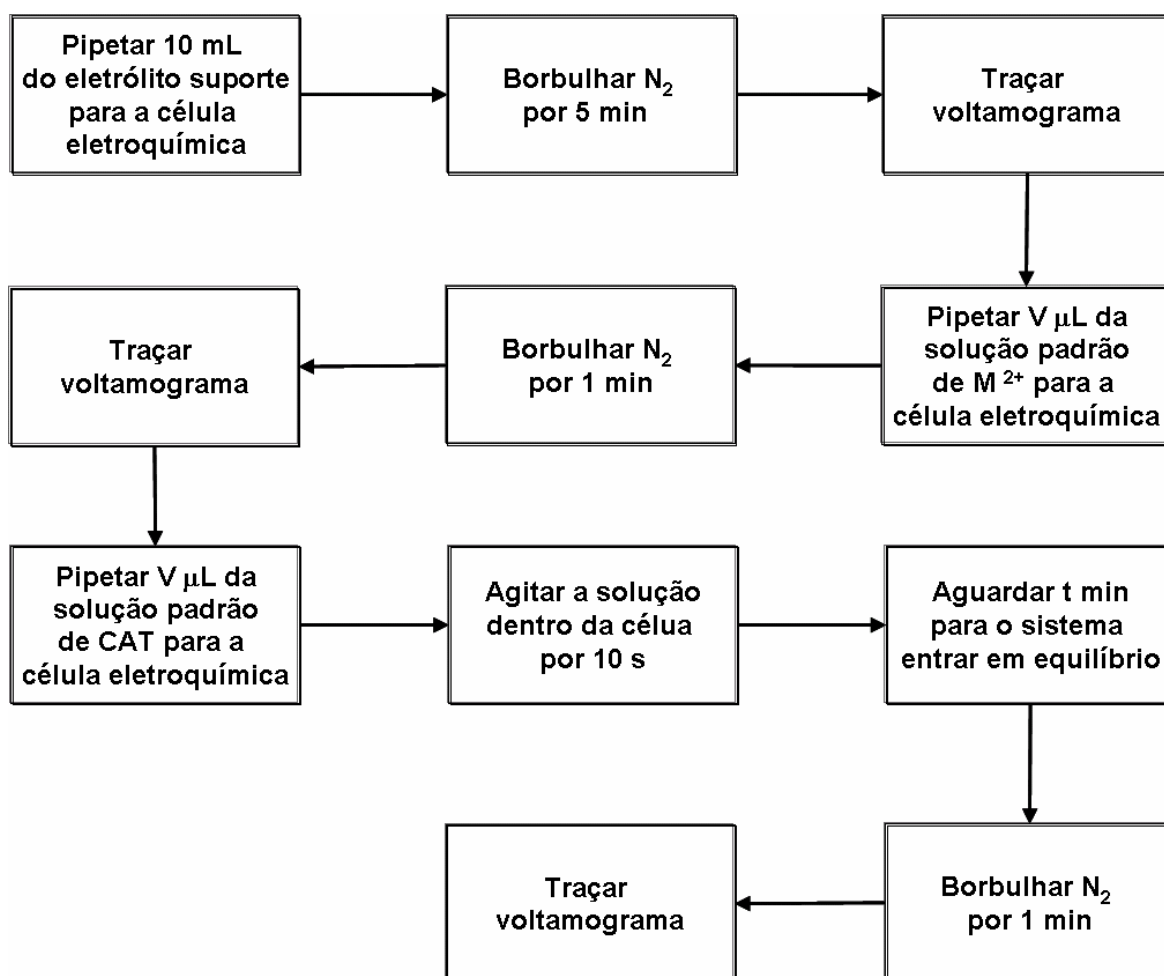


Figura 36. Diagrama esquemático do procedimento adotado na titulação amperométrica do íon M^{2+} com a CAT e no estudo do processo de oxidação do M^{2+} na presença da CAT. $M^{2+} = Zn^{2+}$ ou Cu^{2+}

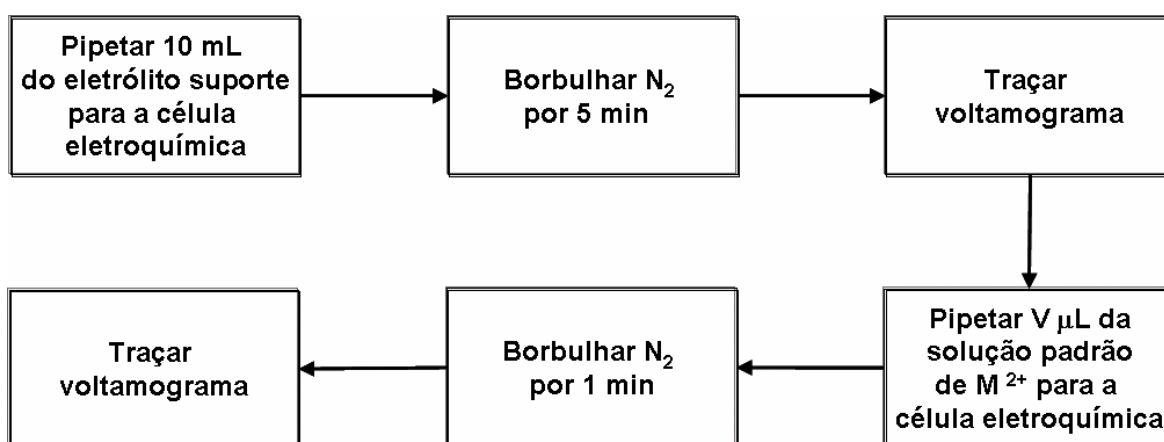


Figura 37. Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo do processo de oxidação - redução do M^{2+} na ausência da CAT. $M^{2+} = Zn^{2+}$ ou Cu^{2+}

Os parâmetros e as condições experimentais ótimos da análise por voltametria cíclica são mostrados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11. Parâmetros ótimos utilizados na análise por CV

Operações	Parâmetros	
	Zn ²⁺	Cu ²⁺
E _i (Potencial inicial) / V	- 0,1	0,15
E _w (Potencial inversão) / V	- 1,4	- 0,5
Nº de varreduras	1	1
Área da gota / mm ²	0,3	0,3

Tabela 12. Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por CV

Condições Experimentais	Zn ²⁺	Cu ²⁺
Titulação Amperométrica		
Eletrólito suporte	Tampão borato pH 7,00	Tampão McIlvaine pH 7,00
[M ²⁺] / mol L ⁻¹	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³
[CAT] / mol L ⁻¹	5,35 x 10 ⁻⁵	5,35 x 10 ⁻⁵
V _{M²⁺} / µL	100	100
V _{CAT} / µL	20	20
Nº de adições de CAT	8	8
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	50	50
t _{equilíbrio} / min	10	15
Estudo do processo de oxidação-redução do M²⁺ na ausência de CAT		
[M ²⁺] / mol L ⁻¹	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³
V _{M²⁺} / µL	100	100
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	5, 10, 20, 50, 100, 150	5, 10, 20, 50, 100, 150
Estudo do processo de oxidação-redução do M²⁺ na presença de CAT		
[M ²⁺] / mol L ⁻¹	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³
[CAT] / mol L ⁻¹	5,35 x 10 ⁻⁵	5,35 x 10 ⁻⁵
V _{M²⁺} / µL	100	100
V _{CAT} / µL	100	100
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	5, 10, 20, 50, 100, 150	5, 10, 20, 50, 100, 150
t _{equilíbrio} / min	10	15

t_{equilíbrio} é o tempo necessário para o complexo M²⁺ – CAT estabilizar.

2.6.3 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada para estudar a interação da CAT com o íon Cu^{2+} por meio de uma titulação amperométrica. O procedimento utilizado está descrito na Figura 36. Os parâmetros e as condições experimentais ótimos da análise por voltametria de pulso diferencial são mostrados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros ótimos utilizados na análise por DPV

Operações	Parâmetros
Tempo de Equilíbrio / s	10
Amplitude do pulso / mV	50
Velocidade de Varredura / mV s^{-1}	60
Potencial inicial / V	0,1
Potencial Final / V	-0,3
Área da Gota / mm^2	0,3

Tabela 14. Condições experimentais ótimas utilizadas na análise por DPV

Condições Experimentais	Cu^{2+}
Eletrólito suporte	Tampão McIlvaine pH 7,00
$[\text{M}^{2+}] / \text{mol L}^{-1}$	1×10^{-3}
$[\text{CAT}] / \text{mol L}^{-1}$	$5,35 \times 10^{-5}$
$V_{\text{M}^{2+}} / \mu\text{L}$	50
$V_{\text{CAT}} / \mu\text{L}$	10
Nº de adições de CAT	8
$t_{\text{equilíbrio}} / \text{min}$	15

$t_{\text{equilíbrio}}$ é o tempo necessário para o complexo Cu^{2+} – CAT estabilizar.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. PREPARAÇÃO DA ENZIMA CATALASE

A pureza da catalase comercial (sigma) foi verificada por espectrometria de massa MALDI-TOF, e observou-se a presença de constituintes de baixa massa molecular (menores que 14000 Da). Com o objetivo de remover estes constituintes (moléculas de baixa massa molecular), realizou-se uma diálise contra água. Após a diálise, a pureza da catalase comercial foi verificada novamente por espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 38b).

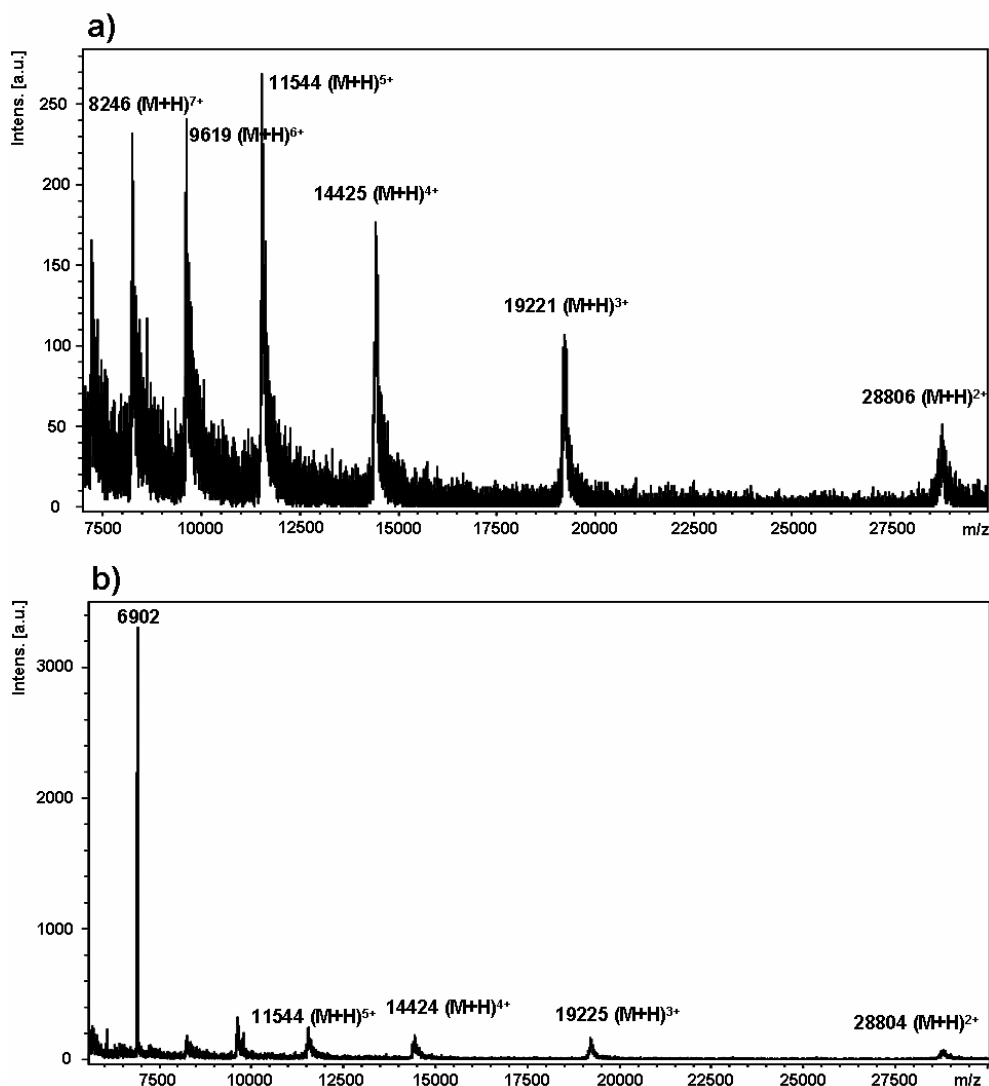


Figura 38. Espectro de massa MALDI – TOF para a solução de catalase: a) antes da diálise; b) depois da diálise.

A diálise não foi suficiente para a remoção de todos os constituintes de baixa massa molecular, podendo até ter causado a degradação da enzima (pico em 6902 Da). No entanto, não se pode afirmar que o pico intenso em 6902 Da (Figura 38b), que apareceu no espectro de massa após a diálise, seja um peptídeo proveniente da degradação da enzima. A remoção de sais pela diálise pode ter favorecido a sua detecção, ou seja, este componente já poderia estar presente antes da diálise, e sua ionização não foi possível devido a grande quantidade de sais.

A catalase foi caracterizada por meio do aparecimento de picos no espectro de massa correspondentes ao seu monômero (MM = 57608 Da) e suas respectivas cargas (dupla, tripla, até a octa carga). Todos os constituintes de baixa massa molecular estão presentes em baixas concentrações em relação à catalase (picos de intensidade menores), portanto não são considerados possíveis interferentes nos estudos voltamétricos. Sendo assim optou-se por não realizar uma nova diálise, para evitar uma possível degradação da enzima.

A solução de catalase foi padronizada utilizando a espectroscopia UV-Vis, a Lei de Beer e o método de Murphy e Kies. Os valores de absorbância foram medidos nos comprimentos de onda 205, 215, 225 e 280nm (Tabela 15).

Tabela 15. Valores médios (n =3) de absorbância da solução de catalase

Comprimento de onda (nm)	205	215	225	280
Absorbância	0,956	0,512	0,275	0,041

Para o cálculo da concentração de catalase pela Lei de Beer, foi necessário calcular o valor da absorvidade molar (ϵ) em 280 nm pelo método de Edelhoch. Neste método foi preciso fazer duas considerações quanto ao número de cistinas (pontes dissulfeto) na estrutura da catalase, pois não foi encontrado na literatura e em banco de dados o número exato de cistinas na CAT. Nas duas considerações propostas os valores obtidos para concentração da catalase foram semelhantes, mostrando que o uso de ambas as concentrações para os estudos voltamétricos seria adequada. O valor de $5,35 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ da concentração de CAT foi considerado para a determinação dos parâmetros quantitativos.

1) Cálculo da absorvidade molar em 280 nm pelo método de Edelhoch

1.1) Assumindo que a metade do número de cisteínas é igual ao número de cistinas.

$$\epsilon (280 \text{ nm}) (\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de triptofanos} = 24) (5500) + (\text{n}^\circ \text{ de tirosinas} = 84) (1490) + (\text{n}^\circ \text{ de cistinas} = 8) (125)$$

$$\epsilon (280 \text{ nm}) = 258.160,00 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

1.2) Assumindo que não possui cistinas na estrutura da catalase.

$$\epsilon (280 \text{ nm}) (\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de triptofanos} = 24) (5500) + (\text{n}^\circ \text{ de tirosinas} = 84) (1490) + (\text{n}^\circ \text{ de cistinas} = 0) (125)$$

$$\epsilon (280 \text{ nm}) = 257.160,00 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2) Cálculo da concentração de catalase pela Lei de Beer

2.1) $\epsilon (280 \text{ nm}) = 258.160,00 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$A = 0,041; b = 1 \text{ cm}$$

$$A = \epsilon b c$$

$$c = 5,33 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ (considerando o fator de diluição de } 10 \text{ mL/ } 30 \text{ }\mu\text{L)}$$

2.2) $\epsilon (280 \text{ nm}) = 257.160,00 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$A = 0,041; b = 1 \text{ cm}$$

$$A = \epsilon b c$$

$$c = 5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ (considerando o fator de diluição de } 10 \text{ mL/ } 30 \text{ }\mu\text{L)}$$

3) Cálculo da concentração de catalase pelo método de Murphy e Kies:

$$A_{205} = 0,956; A_{215} = 0,512; A_{225} = 0,275; MM_{\text{catalase}} = 230452,24 \text{ Da}$$

$$(A_{215} - A_{225}) 144 = K$$

$$K = 34,0800$$

$$(A_{205}) 31 = T$$

$$T = 29,6463$$

$$(K + T) / 2 = C$$

$$C = 31,8632 \text{ mg/L;}$$

Fazendo a conversão para mol L^{-1}

$$C = 4,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ (considerando o fator de diluição de } 10 \text{ mL/ } 30 \text{ }\mu\text{L)}$$

2. ESTUDO TEÓRICO SOBRE OS POSSÍVEIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS NA CATALASE

Por meio de pesquisa em banco de dados e artigos científicos foi montada a Tabela 16 com os peptídeos que se ligam aos íons metálicos Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} . Estes peptídeos foram utilizados como padrões no estudo teórico para a identificação de possíveis sítios de ligação de íons metálicos na catalase.

Tabela 16. Peptídeos que se ligam aos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+}

SEQÜÊNCIA	PROTEÍNA	METAIS	Ref
TNNIFCSNPNHRTPTLTSIYCRGCSKPLCCSC ALLDSSHSELKCDISAE	Proteína PML	Zn^{2+} e Cu^{2+}	119
RPLEKCEHDERLKLYCKDDGTLSCVICRDS LKHASHNFLPI	Proteína PML	Zn^{2+} e Cu^{2+}	119
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	Proteína β - Amilóide	Zn^{2+}	120
GVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDV	Precursor da proteína amilóide	Zn^{2+}	121
AACDICGKNFSQSDELTTHTHT	Peptídeo sintético da "Zinc Finger"	Zn^{2+}	122
AACDIHGKNFSQSDELTTHTHT	Peptídeo sintético da "Zinc Finger"	Zn^{2+}	122
YQCQYCEKRAADSSNLKTHIKTKHS	Peptídeo sintético da "Zinc Finger"	Zn^{2+}	122
YQCQYDEKRAADSSNLKTHIKTKHS	Peptídeo sintético da "Zinc Finger"	Zn^{2+}	122
SYGMLLPCGVDQFHGTEYVCCPQTKDY	Proteína β - Amilóide	Zn^{2+}	123
GSGMLLPCGSDRFRGVEYVCCPPPATP	Proteína β - Amilóide	Zn^{2+}	123
TFAMLLPCGISVFSGVEFVCCPKHFKT	Proteína β - Amilóide	Zn^{2+}	123
DYGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEES	Proteína β - Amilóide	Zn^{2+}	123
NQCAYCKEKGHWAKDCPK	Peptídeo Retroviral	Zn^{2+}	124
KYACAACAAAFAAKAALAAHAAAHAK	Peptídeo sintético da "Zinc Finger"	Zn^{2+}	125
RPYACPVECDRRFSTRQARRNHRRRHRRG	"Zinc Finger"	Zn^{2+}	59
KPFQCRICMRNFSTRQARRNHRRRHRRG	"Zinc Finger"	Zn^{2+}	59
KPFQSRISMRNFSTRQARRNHRRRHRRG	"Zinc Finger"	Zn^{2+}	59
AAAATRQARRNHRRRHRRRAAAAR	"Zinc Finger"	Zn^{2+}	59
LCEYTHGHCGVVKDGEIVN	Ácido delta- aminolevulínico	Zn^{2+}	Swiss-Prot
PEMVVVADTCLCEYTDHGHCGLVKDGVILN	Ácido delta- aminolevulínico	Zn^{2+}	Swiss-Prot
MGCDDKCGCAVPCPGGTGCRCTSARSGAA AGEHTTCGCGEHCGCNPACGREGTPSGR ANRRANCSCGAACNCASCGSATA	Metalotioneína	Zn^{2+}	126
DVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLH	Proteína β - Amilóide	Cu^{2+}	121
DKCKFLHQER	Proteína β - Amilóide	Cu^{2+}	Swiss-Prot

Tabela 16. Peptídeos que se ligam aos íons metálicos Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺

(continuação)

SEQÜÊNCIA	PROTEÍNA	METAIS	Ref
MDVCETHLHW	Proteína β - Amilóide	Cu ²⁺	Swiss-Prot
HTVAKETCSE	Proteína β - Amilóide	Cu ²⁺	Swiss-Prot
MDAEFRHDSG	Proteína β - Amilóide	Cu ²⁺	Swiss-Prot
YEVHHQKLVF	Proteína β - Amilóide	Zn ²⁺ e Cu ²⁺	Swiss-Prot
QGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWG QPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGGTHSQ	Proteína do Prion humano	Cu ²⁺	127
KGHK	SPARC	Cu ²⁺	128
TLEGTKKGHKLHLDYIG	SPARC	Cu ²⁺	128
CQNHHCCKHGKVCCELDESNTPT	SPARC	Cu ²⁺	128
GGGWGQPHGGGGWGQP	Prion	Cu ²⁺	129
HGGG	Prion	Cu ²⁺	129
HGGGW	Prion	Cu ²⁺	129
WGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQ	Prion	Cu ²⁺	129
GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGG WGQ	Prion	Cu ²⁺	129
GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGG WGQPHGGGGWGQ	Prion	Cu ²⁺	129
NPGYPHNPGYPHNPGYP	Prion	Cu ²⁺	129
PHGGGGWGQ	Prion	Cu ²⁺	130
GGH	-	Cu ²⁺	36
ECG	-	Cu ²⁺ e Pb ²⁺	131
PHGGGGWGQ	Prion	Cu ²⁺	131
KCTCCA	Metalotioneína	Cd ²⁺	132
GCGCPCGC	Proteína LamB	Cd ²⁺	133
GHHPHG	Proteína LamB	Cd ²⁺	133
ECECECG	-	Cd ²⁺	134
ECECECECG	-	Cd ²⁺	134
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTHTG	Peptídeo do Consenso	Zn ²⁺ e Pb ²⁺	135
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTCTG	Peptídeo do Consenso	Zn ²⁺ e Pb ²⁺	135
PYKCPECGKSFSQKSDLVKCQRTCTG	Peptídeo do Consenso	Zn ²⁺ e Pb ²⁺	135
VKCFNCGKEGHIARNCRA	Proteína HIV	Zn ²⁺ e Pb ²⁺	135
HGH	BSA	Cu ²⁺	136
EAHKSEIAHRFKDL	RSA	Cu ²⁺	60
DAHKSEVAHRFKDL	HSA	Cu ²⁺	60
DTHKSEIAHRFKDL	BSA	Cu ²⁺	60
DTYKSEIAHRFKDL	PSA	Cu ²⁺	60
EAYKSEIAHRYNDL	DAS	Cu ²⁺	60
DAEHKSEIAHRYNDL	CSA	Cu ²⁺	60
FLHQERMDVCETHLHWHTVAKE	APP	Cu ²⁺	137
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGA IIGLMVGGVV	β - Amilóide	Cu ²⁺	137
PHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWG QPHGGGGWGQ	PrP	Cu ²⁺	137
DAH	Albumina	Cu ²⁺	138
SSH	Albumina	Cu ²⁺	138

Tabela 16. Peptídeos que se ligam aos íons metálicos Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺
(continuação)

SEQUÊNCIA	PROTEÍNA	METAIS	Ref
VIHN	Albumina	Cu ²⁺	138
DAHK	Albumina	Cu ²⁺	138
RTHGN	Albumina	Cu ²⁺	138
GLKALEEKCKALEEKLKALEEKLKALEEKG	TRI L9C	Cd ²⁺	139
GLKALEEKLKACEEKLKALEEKLKALEEKG	TRI L12C	Cd ²⁺ e Pb ²⁺	139
GLKALEEKLKALEEKCKALEEKLKALEEKG	TRI L16C	Cd ²⁺ e Pb ²⁺	139
PHGHGHGHGP	-	Zn ²⁺	140
HDHTHDE	-	Zn ²⁺	140
MKETAAAKFERQHMDPDLGTLVPRGS	-	Cd ²⁺	141
MGKAAAACSCATGGSCCTCTGSCKCKECKC NSCKKAAAA	-	Cd ²⁺	141
MGKAAAACCSCCPMSCAKCAQGCVCKGAS EKCSCKKAAAA	-	Cd ²⁺	141
MGKAAAACSCATGGSCCTCTGSCKCKECKC NSCKKAAAACCSCCPMSCAKCAQGCVCKG ASEKCSCKKAAAA	-	Cd ²⁺	141
MDPNCSCAAAGDSCTCANSCTCKACKCTSCK KSCCSCPPGCAKCAQGCICKGASDKSCCA	-	Cd ²⁺	141

Com o software Scale index foram calculados os valores de três parâmetros físico-químicos (ponto isoelétrico, massa molecular e momento hidrofóbico - escala CCS), dos peptídeos padrões (Tabela 17) e dos peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com as enzimas GluC2 e V8-proteinase (Tabelas 18 e 19), por meio dos softwares já mencionados anteriormente.

O ponto isoelétrico é o valor de pH onde uma molécula (aminoácido, peptídeo ou proteína) apresenta carga elétrica líquida igual a zero. A massa molecular é a soma das massas moleculares dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos ou proteínas. O momento hidrofóbico é a hidrofobicidade de um peptídeo medido para diferentes ângulos de rotação por resíduo de aminoácido e a escala CCS utilizada é um consenso obtido a partir da normalização das escalas de diversos autores.

Estes parâmetros físico-químicos foram escolhidos em função de serem semelhantes às características que são utilizadas para separação de peptídeos e proteínas por meio das seguintes técnicas: cromatografia de troca iônica – ponto isoelétrico; cromatografia de exclusão molecular - massa molecular; cromatografia de fase reversa – momento hidrofóbico.

Tabela 17. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos utilizados como padrões no estudo teórico

SEQÜÊNCIA	MM	pl	MH
TNNIFCSNPNHRTPTLTSIYCRGCSKPLCCSC ALLDSSHSELKCDISAE	5331,40	6,9	0,9737
RPLEKCSEHDERLKLYCKDDGTLSCVICRDS LKHASHNFLPI	4868,40	7,1	1,2172
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	3260,52	5,2	0,5166
GVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDV	2958,15	2,9	0,7897
AACDICGKNFSQSDELTTTHIRTHT	2647,21	6,1	1,6839
AACDIHGKNFSQSDELTTTHIRTHT	2681,26	6,4	1,6368
YQCQYCEKRAADSSNLKTHIKTKHS	2938,42	8,7	0,9117
YQCQYDEKRAADSSNLKTHIKTKHS	2950,43	8,6	0,8508
SYGMLLPCGVDQFHGTEYVCCPQTKDY	3053,30	4,4	1,0577
GSGMLLPCGSDRFRGVEYVCCPPPATP	2808,28	6,1	0,9255
TFAMLLPCGISVFSGVEFVCCPKHFKT	2960,44	8	0,7510
DYGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEES	2990,36	4	1,2351
NQCAYCKEKGHWAKDCPK	2107,93	8,3	1,3599
KYACAACAAFAAKAALAHAHAHAHAK	2442,24	8,9	0,6835
RPYACPVESCDRRFSTRQARRNHRRRHRRG	3778,94	9,2	0,6677
KPFQCRICMRNFSTRQARRNHRRRHRRG	3622,90	9,6	0,8512
KPFQSRISMRNFSTRQARRNHRRRHRRG	3590,95	10,2	0,9743
AAAATRQARRNHRRRHRRRAAAAR	2717,60	10,2	0,6624
LCEYTTGHGCGVVKDGEIVN	2679,52	10,1	0,7396
PEMVVVADTCLCEYTDHGHCGLVKDGVILN	2172,99	5,2	1,7159
MGCDDKCGCAVPCPGGTGCRCTSARSGAA AGEHTTCGCGEHCGCNPACGREGTPSGR ANRRANCSCGAACNCASCGSATA	3229,49	4,2	1,4846
DVCETHLHWHTVAKETCSEKSTNLH	7706,94	7,5	0,1173
DKCKFLHQR	2904,32	6,1	1,3865
MDVCETHLHW	1302,65	8,4	1,0383
HTVAKETCSE	1269,52	5,1	1,9211
MDAEFRHDSG	1103,49	5,3	1,6115
YEVHHQKLVF	1163,46	4,4	1,4058
QGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHG GGWGQPHGGGWGQGGGTHSQ	1298,67	7,6	0,5697
KGHK	4479,91	8,3	0,3085
TLEGTKKGHKLHLDYIG	468,28	9,8	3,3014
CQNHCKKHGKVCELDESNT	1909,04	8,7	1,8985
GGWGQPHGGGWGQ	2277,96	6,4	0,5693
HGGG	1433,62	8	1,4975
HGGGW	326,13	8	0,5972
WGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	512,21	8	1,6956
GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	1941,84	8,1	0,9330
GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ HGGGWGQ	2532,09	8,2	0,5272
NPGYPHNPGYPHNPGYP	3308,43	8,3	0,1148
PHGGGWGQ	1876,82	7,5	0,2235
GGH	794,34	8	1,8214
ECG	269,11	8	0,6370
PHGGGWGQ	307,08	3,8	1,9423
KCTCCA	794,34	8	1,8214
GCGCPCGC	627,21	8	1,3470

MM – Massa Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; MH – Momento Hidrofóbico- escala CCS. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software Scale Index.

Tabela 17. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos utilizados como padrões no estudo teórico (continuação)

SEQÜÊNCIA	MM	pl	MH
GHPHG	698,16	5,6	0,2278
ECECECG	640,28	8,2	1,0482
ECECECECG	771,18	3,4	0,7326
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTHTG	1003,23	3,3	0,4986
PYKCPECGKSFSQKSDLVKHQRTCTG	2960,43	8,7	0,5359
PYKCPECGKSFSQKSDLVKCQRTCTG	2926,38	8,6	0,5107
VKCFNCGKEGHIARNCRA	2892,33	8,4	0,4601
HGH	2004,95	8,7	1,3951
EAHKSEIAHRFKDL	349,14	8,1	0,3600
DAHKSEVAHRFKDL	1679,87	7,5	2,7998
DTHKSEIAHRFKDL	1651,84	7,5	2,4770
DTYKSEIAHRFKDL	1695,86	7,5	2,9686
EAYKSEIAHRYNDL	1721,87	7,3	3,2650
DAEHKSEIAHRYNDL	1707,82	5,4	2,5372
FLHQERMDVCETHLHWHTVAKE	1796,84	5,2	1,8346
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG A IIGLMVGGVV	2745,29	6,1	1,2954
PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPH GGGWGQ	4327,14	5,2	0,8278
DAH	3123,35	8,3	0,2422
SSH	341,13	5,1	1,5144
VIHN	329,13	8	0,9783
DAHK	481,26	8	4,0568
RTHGN	469,22	7,6	3,2335
GLKALEEKCKALEEKLKALEEKLKALEEKG	583,28	9,4	2,6701
GLKALEEKLKACEEKLKALEEKLKALEEKG	3367,90	6,5	3,2945
GLKALEEKLKALEEKLKALEEKLKALEEKG	3367,90	6,5	3,1373
PHGHGHGHGP	3367,90	6,5	3,1954
HDHDE	988,43	8,3	0,2693
MKETAAAKFERQHMDPDLGTLVPRGS	889,33	5,1	1,1531
MGKAAAACSCATGGSCTCTGSCKCKECKC NSCKKAAAA	2884,43	7,3	0,3902
MGKAAAACSCCPMSCAKCAQGCVCCKGAS EKCSCKKAAAA	3606,48	8,4	0,1144
MGKAAAACSCATGGSCTCTGSCKCKECKC NSCKKAAAACSCCPMSCAKCAQGCVCCKG ASEKCSCKKAAAA	3935,58	8,2	0,5837
MDPNCSCAAAGDSCTCANSCTCKACKCTSCK KSCCSCPPGCAKCAQGCICKGASDKSCCA	6923,75	8,2	0,4268
TNNIFCSNPNHRTPTLTSIYCRGCSKPLCCS CALLDSSHSELKCDISAE	6078,18	7,8	0,4687

MM – Massa Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; MH – Momento Hidrofóbico- escala CCS. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software Scale Index.

Tabela 18. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima GluC2

SEQUÊNCIA	MM	pl	MH
NRD	403,18	6,5	2,4735
TVRD	489,25	6,5	3,6660
VTHD	470,21	5,1	1,5810
GNWD	490,18	3,7	3,6914
MVWD	549,22	3,7	3,0666
PASD	388,15	3,7	1,8940
RIPE	513,29	6,6	5,5329
PSPD	414,17	3,7	1,1400
VHPE	480,23	5,1	0,9008
KYNE	552,25	6,5	3,5961
KANL	444,26	9,5	1,8211
RGIPD	556,29	6,5	5,2790
VVFTD	579,29	3,7	2,8676
YGLRD	622,30	6,4	3,5427
QLAFD	592,28	3,7	1,7964
SGSAD	435,16	3,7	1,7134
MAHFD	619,24	5,1	3,0913
AARLAHE	766,40	7,5	2,8086
QMKHWKE	985,48	9,1	3,8451
FWSLRPE	933,47	6,6	2,0323
GPMCMMD	783,24	3,7	1,9748
HQPSALE	780,37	5,1	1,9720
QRKRLCE	931,50	8,9	2,7814
IFPFNPF	995,47	3,7	1,3745
HRTHFSGD	955,42	7,7	0,6464
QRAAQKPD	912,47	9	2,2342
NIAGHLKD	866,46	7,6	4,2765
PSNMPPGIE	940,43	3,8	2,5655
QGIKNLSVE	986,53	6,7	3,0036
VQRFNSAND	1049,48	6,5	2,8067
LTKVWPHGD	1051,54	7,6	3,0625
YGSRIQALLD	1134,60	6,4	3,6862
PRGFAVKFYTE	1313,67	8,8	1,9952
ITRYSKAKVFE	1340,74	9,1	0,6267
SLHQVSFLFSD	1278,62	5,1	2,1839
AVYCKFHFKTD	1373,64	8,4	1,5283
VLTTGGGNPVG	1085,53	3,7	1,6883
KMLQGRLFAYPD	1437,74	8,8	2,3867
LVGNNTPIFFIRD	1504,80	6,5	0,6350
NVTQVRTFYLVKVLNE	1822,99	8,8	2,5716
RVVHAKGAGAFGYFE	1607,82	8,8	1,7908
AQLFIQKKAVKNFSD	1735,96	9,4	1,7359
KLNSLVGPRGPLLVQD	1806,03	9	0,6531
NQGGAPNYYPNSFSAPE	1811,77	3,8	1,0920
HIGKRTPIAVRFSTVAGE	1938,07	9,3	1,2958
KPKNAVHTYVQHGSHLSARE	2258,16	9,1	1,5203
GHRHMNGYGSHTFKLVNANGE	2325,08	8,8	1,9290
ALLFPSFIHSQKRNPQTHLKD	2476,33	9,3	1,8816
YPLIPVGKLVNLRNPVNYFAE	2415,33	8,6	0,8562
LFNAIATGNYPSTWLYIQVMTFSE	2765,34	3,8	1,4017
THRHRLGPNYLQIPVNCYPYRVARVANYQRD	3506,79	8,9	0,2429

MM – Massa Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; MH – Momento Hidrofóbico- escala CCS. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software Scale Index.

Tabela 19. Parâmetros físico-químicos dos peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima V8-proteinase

SEQÜÊNCIA	MM	pl	MH
ADNRDPASDQMKHWKE	1926,86	5,4	2,4530
QRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGPR GPLLVQDVVFTDE	4458,35	4,6	1,1114
MAHFDRE	904,38	5,3	3,2684
RIPE	513,29	6,6	5,5329
RVVHAKGAGAFGYFE	1607,82	8,8	1,7908
HIGKRTPIAVRFSTVAGE	1938,07	9,3	1,2958
SGSADTVRDPGRGFAVKFYTE	2202,07	6,5	2,0937
DGNWDLVGNNTPIFFIRDALLFPSFIHSQKRNPQTHLK DPDMVWDFWSLRPE	6209,07	5,3	1,1384
SLHQVSFLFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGE	4123,98	7,6	1,3531
AVYCKFHYKTDQGKIKLSVE	2342,17	8,3	2,0464
DAARLAHE	881,43	5,3	2,7349
DPDYGLRDLFNAIATGNYPSTLYIQVMTFSE	3696,74	3,7	1,6738
AE	218,09	3,8	4,0905
IFPFNPFDLTKE	1337,70	6,6	0,9341
VWPHGDYPLIPVGKLVNLRNPVNYFAE	3106,63	7,3	0,3993
VE	246,12	3,8	4,9375
QLAFDPSNMPPGIE	1514,70	3,5	1,5761
PSPDKMLQGRLFAYPDTHRHLGPNYLQIPVNCPYRA RVANYQRDGPMMMDNQGAPNYYPNSFSAPE	7881,69	8,1	0,7333
HQPSALE	780,37	5,1	1,9720
HRTHFSGDVQRFNSANDDNVTQVRTFYKLVNE	3906,91	7,4	1,9453
EQRKRLCE	1060,54	8,4	3,3488
NIAGHLKDAQLFQKKAIVNFSDVHPE	3046,63	8,7	1,7578
YGSRIQALLDKYNE	1668,84	6,5	3,6318
EKPKNAVHTYVQHGSHLSARE	2387,20	8,7	1,7631

MM – Massa Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; MH – Momento Hidrofóbico- escala CCS. Estes parâmetros foram calculados utilizando o software Scale Index.

Utilizando os parâmetros físico-químicos calculados (Tabelas 17 a 19) foram plotados gráficos tridimensionais (Figuras 39 e 40), onde os peptídeos da catalase obtidos pela clivagem com as enzimas GluC2 e V8-proteinase foram avaliados por comparação com os peptídeos padrões. A análise dos gráficos tridimensionais foi feita separadamente para os peptídeos padrões de cada íon metálico com os peptídeos obtidos de cada clivagem com as enzimas GluC2 e V8-proteinase.

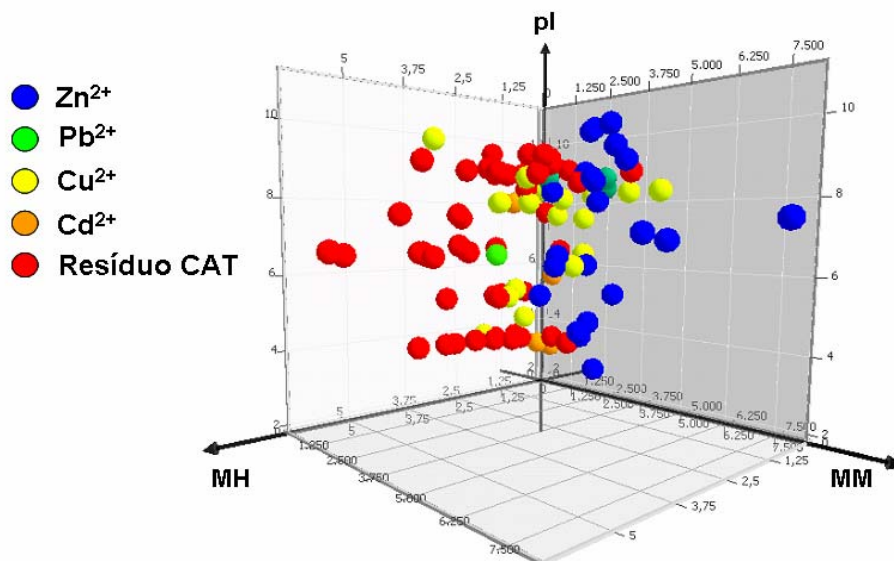


Figura 39. Gráfico tridimensional dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos padrões e dos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima GluC2.

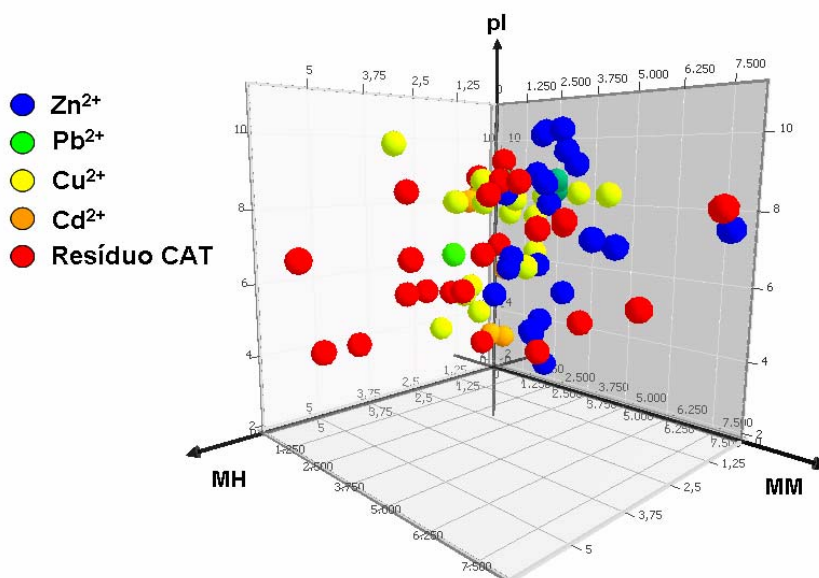


Figura 40. Gráfico tridimensional dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos padrões e dos obtidos pela clivagem da catalase com a enzima V8-proteinase.

Os agrupamentos dos peptídeos observados nos gráficos tridimensionais são formados por peptídeos com parâmetros físico-químicos semelhantes, portanto, por meio destes agrupamentos foram identificados os possíveis candidatos a sítios de ligação dos íons metálicos Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺ (Figuras 41 a 43 e Tabelas 20 a 23).

10	20	30	40	50	60	
MADNRDPASD	QMKHWKEQRA	AQKPDVLTG	GGNPVGDKLN	SLTVGPRGPL	LVQDVVFTDE	
70	80	90	100	110	120	
MAHFD	ERVVHAKGAG	AFGYFEVTHD	ITRYSKAKVF	EHIGKRTPIA	VRFSTVAGES	
130	140	150	160	170	180	
GSADTVRDP	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNT	PIFFIRDALL	FPSFIHSQKR	NPQTHLKDPD	
190	200	210	220	230	240	
MVWDFWSLRP	ESLHQVSFLF	SDRGIPD	GHR	HMNGYGSHTF	KLVNANGEAV	YCKFHYKTD
250	260	270	280	290	300	
GIKNLSVEDA	ARLAHEDPDY	GLRDLFNAIA	TGNYPSTWLY	IQVMTFSEAE	IFPFNPFDLT	
310	320	330	340	350	360	
KVWPHGDYPL	IPVGKLVLR	NPVNYFAEVE	QLAFDPSNMP	PGIEPSPDKM	LQGRLFAYPD	
370	380	390	400	410	420	
THRHLGPNY	LQIPVNC	PYR	ARVANYQRD	PMCMMDNQGG	APNYYPNSFS	APEHQPSALE
430	440	450	460	470	480	
HRTHFSGDVQ	RFNSANDDNV	TQVRTFYLVK	LNEEQRKRLC	ENIAGHLKDA	QLFIQKKAVK	
490	500	510	520			
NFSDVHPEYG	SRIQALLDKY	NEEKPKNAVH	TYVQHGSLS	AREKANL	Zn ²⁺	

Figura 41. Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e os possíveis sítios de ligação do íon Zn²⁺. Em vermelho, possíveis sítios de ligação do íon Zn²⁺; em azul, resíduos de histidina; em verde, resíduos de cisteína.

Tabela 20. Possíveis sítios de ligação do íon Zn²⁺ na catalase

SEQÜÊNCIA
Clivagem com a enzima GluC2
VTHD
VHPE
MAHFD
HQPSALE
HRTHFSGD
SLHQVSFLFSD
AVYCKFHYKTD
GHRHMNGYGSHTFKLVNANGE
YPLIPVGKLVLRNPVNYFAE
LFNAIATGNYPSTWLYIQVMTFSE
THRHLGPNYLQIPVNC
PYRARVANYQRD

Tabela 20. Possíveis sítios de ligação do íon Zn²⁺ na catalase (continuação)

SEQÜÊNCIA	
Clivagem com a enzima V8-proteinase	
RVVHAKGAGAFGYFE	
HIGKRTPIAVRFSTVAGE	
DPDYGLRDLFNAIATGNYPSTWTLTIQVMTFSE	
VWPHGDYPLIPVGKLVLRNPVNYFAE	
PSPDKMLQGRLFAYPDTHRHRLGPNYLQIPVNCOPYR	
ARVANYQRDGPMMMDNQGGAPNYYPNSFSAPE	
NIAGHLKDAQLFIQKKAVKNFSDVHPE	
EKPKNAVHTYVQHGSLSARE	

10	20	30	40	50	60
MADNRD PASD	QMK H WKEQRA	AQKPDVLTG	GGNPVGDKLN	SLTVGPRGPL	LVQDVVFTDE
70	80	90	100	110	120
MA H FDRE RIP	E RVV H AKGAG	A FGY F EV T HD	ITRYSKAKVF	E HIGKRTPIA	VRFSTVAGE S
130	140	150	160	170	180
GSAD TVRDPR	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNT	PIFFIRDALL	FPSFI H SQKR	NPQ T HLKDPD
190	200	210	220	230	240
MVWDFW S LRP	E SL H QVS F LF	S DRGIPDGHR	H MNGYGS H TF	KLVNANGE A V	Y CK F H Y K T D Q
250	260	270	280	290	300
G IK N LS V E D A	ARLA H EDPDY	GLRDLFN A IA	TGNYPSTWTLY	IQVMTFSEAE	IFPFNPFDLT
310	320	330	340	350	360
KV W PHGDYPL	IPVGKLVLR	NPVNYFAEVE	Q L A F D PSNMP	PGIEPSPDKM	LQGRLFAYPD
370	380	390	400	410	420
T HR H RLGPNY	LQIPVNC P YR	ARVANYQR D G	P MC M MDNQGG	APNYYPNSFS	AP E H Q PS A LE
430	440	450	460	470	480
H RT H F S GD V Q	RFNSANDDNV	TQVRTFYLVK	LNEEQ R K R LC	ENIAG H LKDA	QLFIQKKAVK
490	500	510	520		
NFSD V H P E Y G	SRIQALLDKY	NE E KPKNAV H	TYV Q H G S H LS	ARE K ANL	Cu²⁺

Figura 42. Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e os possíveis sítios de ligação do íon Cu²⁺. Em vermelho, possíveis sítios de ligação do íon Cu²⁺; em azul, resíduos de histidina; em verde, resíduos de cisteína.

Tabela 21. Possíveis sítios de ligação do íon Cu²⁺ na catalase

SEQÜÊNCIA
Clivagem com a enzima GluC2
VTHD
PASD
VHPE
QLAFD
SGSAD
GPMCMMD
HQPSALE
HRTHFSGD
SLHQVSFLFSD
AVYCKFHYKTD
RVVHAKGAGAFGYFE
Clivagem com a enzima V8-proteinase
RVVHAKGAGAFGYFE
AVYCKFHYKTDQGKLNLSVE
HQPSALE
EKPKNAVHTYVQHGSHLSARE

10	20	30	40	50	60
MADNRD PASD	QMK H WKEQRA	AQKPDVLT TG	GGNPVGD KLN	SLTVGPR G PL	LVQ D VVFTDE
70	80	90	100	110	120
MA H FDRERIP	ER VVHAKGAG	AFGYFE VTHD	ITRYSKAK V F	E HIGKRTPIA	VR FSTVAGES
130	140	150	160	170	180
GSAD TVRDPR	GFAVKFY T ED	GNWD L VGNNT	PIFFIR D ALL	FPSFI H SQKR	NPQ T HLKDPD
190	200	210	220	230	240
MVWDFW S LRP	ESL H QVSFLF	SDRGIPD G HR	HMNGYGS H TF	KLVNANG E AV	Y C KFHYKTDQ
250	260	270	280	290	300
G I KNLSVEDA	ARL A HEDPDY	GLRDLF N AIA	TGNYP S WTLY	IQVMT F SEAE	I F PFNP F DLT
310	320	330	340	350	360
K VW P HGDYPL	IPV G KLVLNR	NPVNY F AE V E	Q LAFD P SNMP	PGI E PS P DKM	LQ G R L FAYPD
370	380	390	400	410	420
T HR H RLGPNY	LQIPV N CPYR	ARV A NYQR D G	PM C MM D NQGG	APNYYP S FS	AP E HQPSALE
430	440	450	460	470	480
H R T H F SGDVQ	RFNSAN D DNV	TQV R TFY L KV	LNE E QR K RLC	ENIAG H LKDA	QLFI Q KKAVK
490	500	510	520		
NFSDV H PEY G	SRIQALL D KY	NE E KPKNAV H	TYV Q H G SHLS	ARE K ANL	Pb²⁺
					Cd²⁺

Figura 43. Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e possíveis sítios de ligação dos íons Pb²⁺ e Cd²⁺. Em vermelho, possíveis sítios de ligação do íon Pb²⁺; em amarelo, possíveis sítios de ligação do íon Cd²⁺; em azul, resíduos de histidina; em verde, resíduos de cisteína.

Tabela 22. Possíveis sítios de ligação do íon Pb^{2+} na catalase

SEQÜÊNCIA
Clivagem com a enzima GluC2
PASD
SGSAD
KLNSLTVGPRGPLLVD
HIGKRTPIAVRFSTVAGE
Clivagem com a enzima V8-proteinase
RVVHAKGAGAFGYFE
HIGKRTPIAVRFSTVAGE
EKPKNVHTYVQHGSLSARE

Tabela 23. Possíveis sítios de ligação do íon Cd^{2+} na catalase

SEQÜÊNCIA
Clivagem com a enzima GluC2
PSPD
IFPFNPF
LVGNNTPIFFIRD
NQGGAPNYYPNSFSAPE
THRHLGPNYLQIPVNCYPYRARVANYQRD
Clivagem com a enzima V8-proteinase
VWPHGDYPLIPVGKLVNLRNPVNYFAE
QLAFDPSNMPPGIE
PSPDKMLQGRLFAYPDTHRHLGPNYLQIPVNCYPYR ARVANYQRDGPMMMDNQGGAPNYYPNSFSAPE

O fato de cerca de 70% dos peptídeos, utilizados como padrões, se ligarem aos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , pode ter contribuído para o grande número de possíveis sítios de ligação identificados para estes íons pelo estudo teórico, portanto, o inverso cerca de 30% dos peptídeos, utilizados como padrões, se ligarem aos íons Pb^{2+} e Cd^{2+} , também pode ter contribuído para o pequeno número de possíveis sítios de ligação identificados para estes íons.

Após a identificação dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos, observou-se que alguns sítios foram iguais para dois ou mais íons metálicos (Tabela 24).

Tabela 24. Sítios de ligação de íons metálicos iguais para dois ou mais íons metálicos

Seqüência	Íons
VTHD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
VHPE	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
HQPSALE	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
HRTHFSGD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
SLHQVSFLFSD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
AVYCKFHYKTD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
RVVHAKGAGAFGYFE	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ e Pb ²⁺
EKPKNVHTYVQHGS HLSARE	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ e Pb ²⁺
HIGKRTPIAVRFSTVAGE	Zn ²⁺ e Pb ²⁺
THRHLGPNYLQIPVNC PYRARVANYQRD	Zn ²⁺ e Cd ²⁺
VWPHGDYPLIPVGKLV LNRNPVNYFAE	Zn ²⁺ e Cd ²⁺
PSPDKMLQGRLFAYPDTHRHLGPNYLQIP VNC PYRARVANYQRD GPMC MMDNQGGAP NYYPNSFSAPE	Zn ²⁺ e Cd ²⁺
PASD	Cu ²⁺ e Pb ²⁺
SGSAD	Cu ²⁺ e Pb ²⁺

Como discutido na revisão bibliográfica, os resíduos de histidina (H) e cisteína (C) são os sítios com maior afinidade para ligações com zinco e cobre, e para ligações com cádmio e chumbo, respectivamente. Além da presença destes resíduos o efeito estérico, quando o íon metálico é impedido de se aproximar do sítio de ligação, é um fator muito importante que deve ser considerado quando se estuda a complexação de íons metálicos com uma enzima.

Para prever com mais precisão os possíveis sítios de ligação dos metais na estrutura da catalase, foram excluídos primeiramente os peptídeos que não possuíam os resíduos de His e Cys em sua estrutura. Em seguida com os demais peptídeos e utilizando o software RasMol, verificou-se a localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase (Anexo 2).

Apenas os sítios de ligação listados na Tabela 25, estão localizados na parte externa da estrutura da enzima, aumentando desta forma a possibilidade de ligação de íons metálicos, pois estes sítios estão acessíveis para ligações, não havendo a princípio impedimento estérico.

Tabela 25. Sítios de ligação de íons metálicos localizados na parte externa da estrutura da catalase

Seqüência	Íons
VTHD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
HQPSALE	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
HRTHFSGD	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
HIGKRTPIAVRFSTVAGE	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
VWPHGDYPLIPVGKLVLRNRPVNYFAE	Zn ²⁺ e Cd ²⁺
NIAGHLKDAQLFIQKKAVKNFSDVHPE	Zn ²⁺ e Cu ²⁺
EKPKNVHTYVQHGSLSARE	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ e Pb ²⁺

O estudo teórico aqui utilizado foi apenas uma ferramenta para indicar os possíveis sítios de ligações de íons metálicos na estrutura da catalase, portanto um estudo experimental deve ser realizado para confirmar ou não a complexação de íons metálicos com os sítios indicados pelo estudo teórico.

3. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES E DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS ÓTIMOS PARA O ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA INTERAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS COM A ENZIMA CATALASE

As condições e os parâmetros experimentais ótimos determinados em ensaios prévios para o estudo voltamétrico da interação dos íons metálicos com a catalase são mostrados nas Tabelas 8 a 14, na parte experimental.

3.1 Eletrólito suporte

Para o estudo da interação dos íons metálicos com a enzima catalase por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial, foram realizados inicialmente ensaios com diversos eletrólitos suporte (KNO₃, KNO₃ pH 7,00 (ajustado com NaOH); soluções tampões pH 7,00 de fosfato, borato, Mcllvaine, Trizma HCl e HEPES), para verificar em qual meio seria observado o melhor sinal da corrente de oxidação dos íons metálicos Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺ (Figura 44).

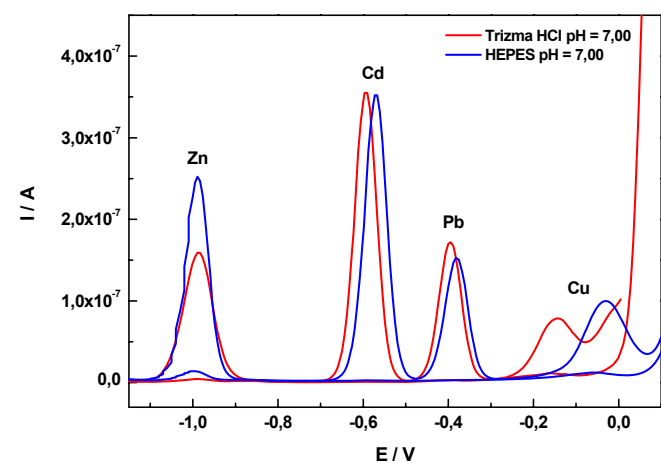
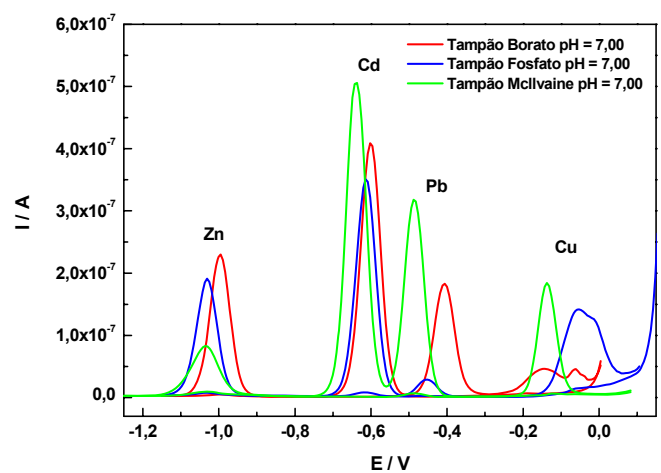
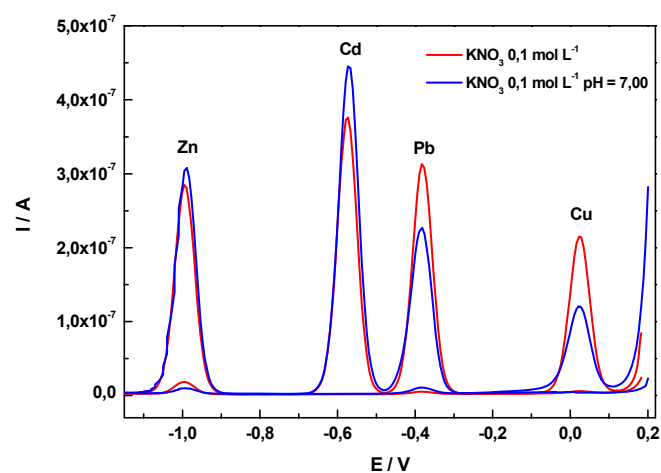


Figura 44. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $E_d = -1.15 \text{ V}$, $t_d = 60 \text{ s}$, $E_i = -1.15 \text{ V}$, $E_f = 0.2 \text{ V}$, $v = 0.06 \text{ V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($KCl \text{ } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

O eletrólito suporte KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi o que apresentou os melhores resultados, porém existe a necessidade de manter o pH da solução fixo em 7,0 (pH fisiológico) durante toda a titulação amperométrica, pois em testes prévios observou-se que em pH ácido não ocorre a complexação dos íons metálicos pela catalase.

A utilização do Trizma HCl não é indicada para o estudo de complexação de íons metálicos, pois consta na literatura estudos que indicam a complexação de íons metálicos por este composto.¹⁴² Foi observado nos experimentos realizados uma redução do sinal da corrente de oxidação dos íons metálicos comparados com o sinal obtido em meio nitrato, indicando uma interação do Trizma HCl com os íons metálicos.

O tampão fosfato não é indicado para o estudo do sistema com o íon Pb^{2+} , pois neste meio não foi observado o sinal da corrente de oxidação deste metal. Para os íons Cd^{2+} e Zn^{2+} os meios borato e fosfato poderão ser utilizados para o estudo da complexação com a catalase. No caso do íon Cu^{2+} , com exceção do nitrato e do tampão Mcllvaine, todos os meios (Trizma HCl, HEPES, tampão borato e tampão fosfato) não apresentaram um sinal de corrente satisfatório, pois foi observado nesses meios picos largos ou dois picos juntos, provavelmente devido a oxidação da espécie Cu^+ . No tampão Mcllvaine, todos os íons metálicos, com exceção do Zn^{2+} , apresentaram um sinal de corrente satisfatório.

Baseando-se nos sinais da corrente de oxidação dos íons metálicos obtidos em diversos eletrólitos suporte, foi escolhido o tampão borato para o estudo do sistema Zn^{2+} – CAT e o tampão Mcllvaine para o estudo dos demais sistemas. O pH foi mantido em 7,00 para todos os sistemas.

3.2 Tempo de equilíbrio

Após a escolha do eletrólito suporte, foi realizado o estudo do tempo necessário para que os sistemas M^{2+} – CAT atingissem o equilíbrio (Figura 45). Observou-se que o tempo de 10 minutos é o suficiente para que o sinal da corrente do sistema Zn^{2+} – CAT fique estável, ou seja não ocorrendo diferenças significativas na medida da corrente após este tempo. Para os sistemas Cu^{2+} – CAT, Cd^{2+} – CAT e Pb^{2+} – CAT o tempo de 15 minutos é o suficiente para que o sinal da corrente fique estável.

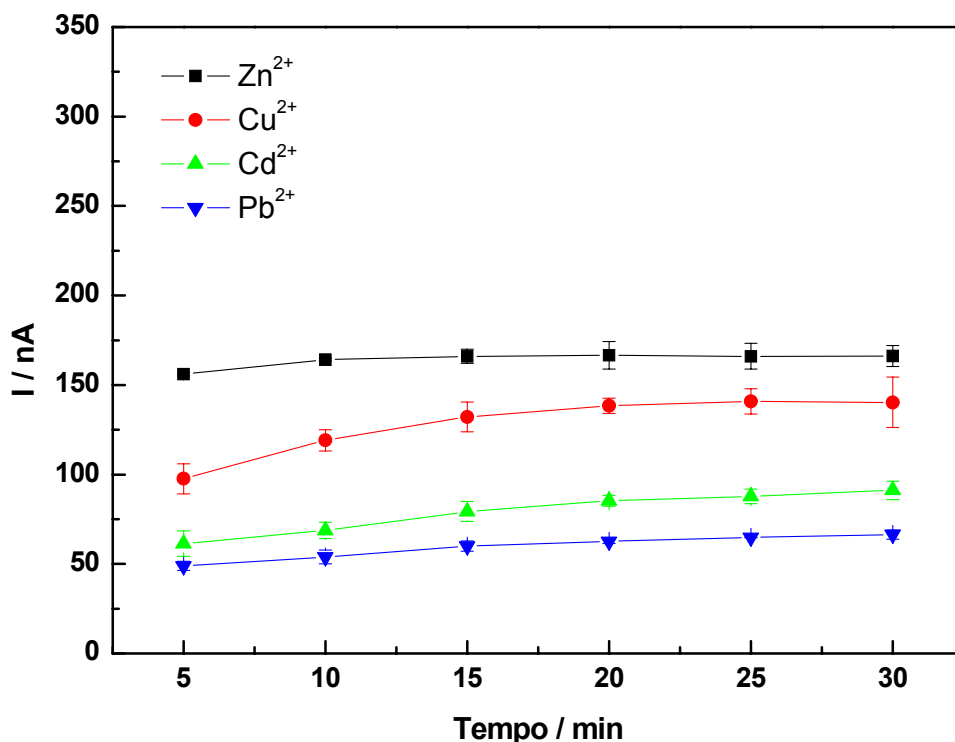


Figura 45. Estudo do tempo para o sistema M^{2+} – CAT atingir o equilíbrio.

Sistema Zn^{2+} – CAT $\rightarrow [Zn^{2+}] = 1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, $[CAT] = 5,35 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, $V_{Zn^{2+}} = 100 \mu\text{L}$, $V_{CAT} = 20 \mu\text{L}$, em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00; Sistema Cu^{2+} – CAT $\rightarrow [Cu^{2+}] = 1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, $[CAT] = 5,35 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, $V_{Cu^{2+}} = 100 \mu\text{L}$, $V_{CAT} = 20 \mu\text{L}$, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00; Sistema Cd^{2+} – CAT $\rightarrow [Cd^{2+}] = 1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $[CAT] = 5,35 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $V_{Cd^{2+}} = 200 \mu\text{L}$, $V_{CAT} = 5 \mu\text{L}$, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00; Sistema Pb^{2+} – CAT $\rightarrow [Pb^{2+}] = 1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $[CAT] = 5,35 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $V_{Pb^{2+}} = 200 \mu\text{L}$; $V_{CAT} = 5 \mu\text{L}$, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00.

4. ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS COM A CATALASE

4.1 Sistema Zn^{2+} - CAT

4.1.1 Estudo da interação do íon Zn^{2+} com a CAT por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

A Figura 46 mostra os voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para 100 μL de Zn^{2+} 1×10^{-4} mol L^{-1} , em 10 mL de tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . A adição da catalase à solução provoca o decaimento da corrente de oxidação do zinco até um valor próximo de zero e o aparecimento de um sinal em torno de -0,95 V, indicando a interação do íon Zn^{2+} com a catalase.

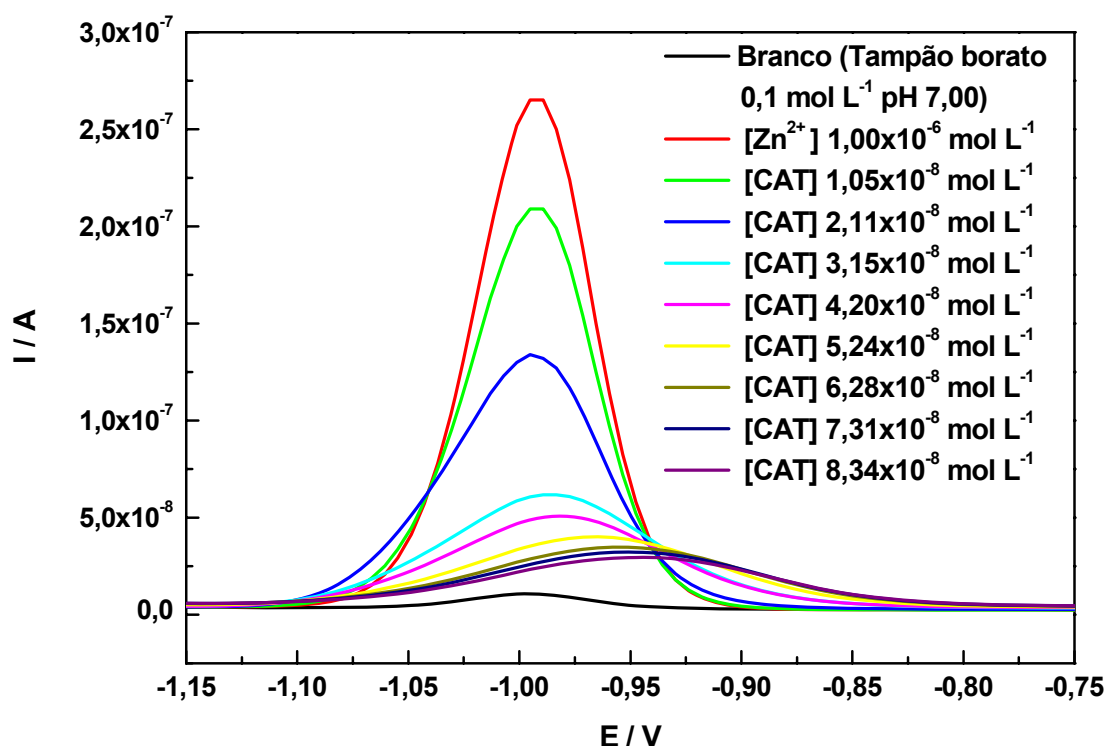


Figura 46. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 100 μL de Zn^{2+} 1×10^{-4} mol L^{-1} em 10 mL de tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . $E_d = -1.15$ V, $t_d = 60$ s, $E_i = -1,15$ V $E_f = -0,75$ V, $v = 60$ mV s^{-1} , Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

A curva de titulação amperométrica (Figura 47) foi obtida com base nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o íon Zn^{2+} na ausência e na presença de CAT. A adição de 94,65 μL de CAT provoca o decaimento da corrente de oxidação do zinco até um valor bem próximo de zero. O volume de CAT adicionado para complexar o Zn^{2+} (P.E.) foi utilizado para calcular a estequiometria do complexo (20 Zn^{2+} : 1 CAT).

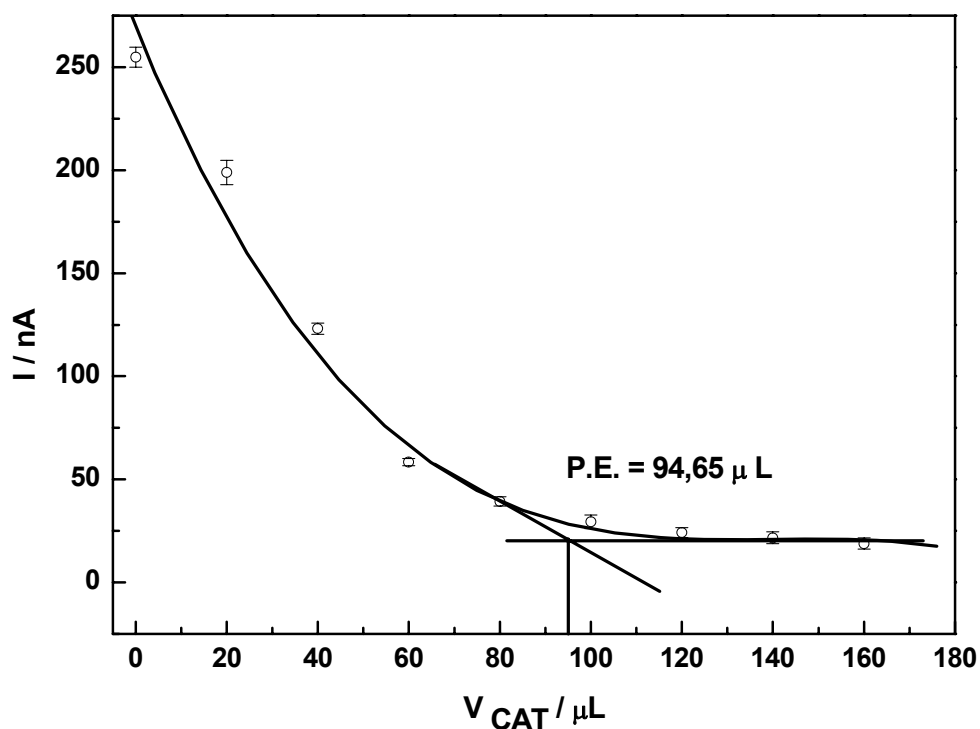


Figura 47. Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Zn²⁺ 1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em 10 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ pH = 7,00 com a catalase. Adições sucessivas de 20 μL da solução de catalase 5,35 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (n_d = 3 determinações).

4.1.2 Estudo da interação do íon Zn²⁺ com a CAT por voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos obtidos para 100 μL de Zn²⁺ 1x10⁻³ mol l⁻¹, em 10 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,00, na ausência e na presença de CAT 5,35 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ são mostrados na Figura 48. Os decaimentos das correntes de oxidação e de redução evidenciam novamente a interação do íon Zn²⁺ com a catalase.

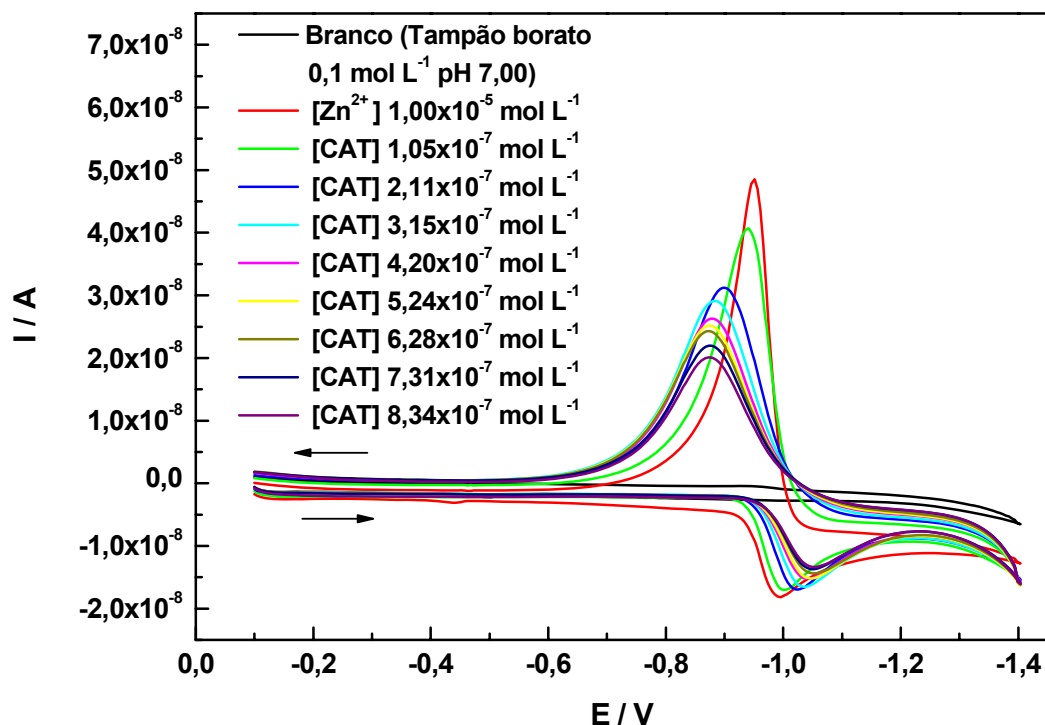


Figura 48. Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_w = -1,14 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

Nas curvas de titulação amperométrica do íon Zn^{2+} com a CAT (Figura 49), foram utilizados os valores de corrente catódica e anódica, com base nos voltamogramas cíclicos para o íon Zn^{2+} na ausência e na presença de CAT. Por meio dos volumes de CAT utilizados para complexar o íon Zn^{2+} (P.E.) calculou-se a estequiometria do complexo ($20 \text{ Zn}^{2+} : 1 \text{ CAT}$). Portanto, em ambas as técnicas de DPASV e CV, a estequiometria encontrada foi a mesma. Este valor determinado experimentalmente para a estequiometria do complexo está bem próximo do número

de possíveis sítios identificados para o zinco na catalase por meio do estudo teórico (sete possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} por monômero na estrutura da catalase; total = 28). A pequena diferença pode ser atribuída ao tamanho da enzima, à sua conformação na superfície do eletrodo e ao pH do meio, que juntos ou individualmente podem ter contribuído para que alguns sítios de ligação, identificados no estudo teórico (Figura 50), tenham se tornado impedidos estericamente de fazerem ligações com íons metálicos, embora tenham sido considerados candidatos nas análises visuais realizadas utilizando o software RasMol. São necessários, portanto, estudos teóricos mais refinados para que as condições experimentais de ligação sejam o mais fielmente reproduzidas.

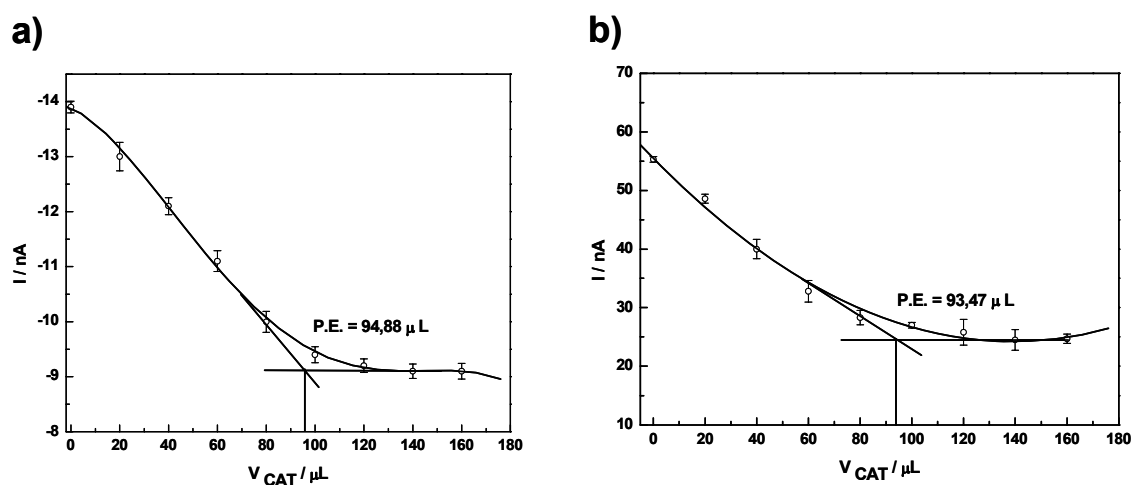


Figura 49. Curvas de titulação amperométrica de 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00 com a catalase: a) Corrente catódica; b) Corrente anódica. Adições sucessivas de 20 μL da solução de catalase $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n_d = 3$ determinações).

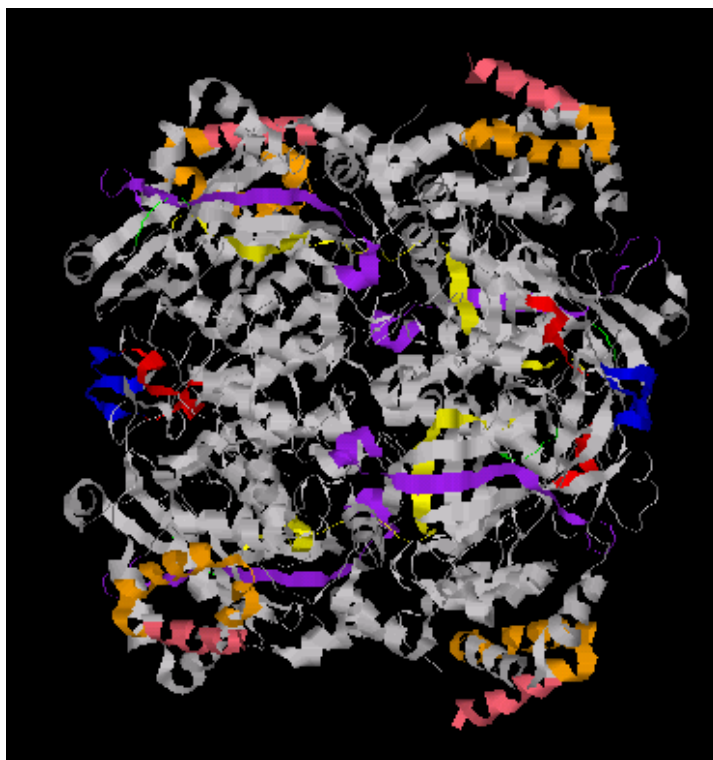


Figura 50. Localização dos possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} na estrutura da catalase identificados no estudo teórico.

O processo de oxidação-redução do zinco foi investigado por meio de curva I (corrente de oxidação) vs $v^{1/2}$ (raiz quadrada da velocidade de varredura). Como descrito pela equação de Randles-Sevcik (Equação 19), I_{pa} e I_{pc} aumentam com $v^{1/2}$. Esta equação fornece uma reta, cuja inclinação pode ser utilizada para determinar o coeficiente de difusão do sistema, para processo redox reversível.

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (19)$$

onde

i_p = corrente de pico (A)

n = número de elétrons

A = área do eletrodo (cm^2)

D = coeficiente de difusão ($cm^2 s^{-1}$)

C = concentração ($mol cm^{-3}$)

v = velocidade de varredura (V/s)

Foi adotada a seguinte convenção, uma corrente positiva significa que o eletrodo de trabalho é um ânodo e uma corrente negativa significa que o eletrodo de trabalho é um cátodo.

Por meio das curvas das Figuras 51 e 52 pode-se dizer que o processo de redução do zinco na superfície do eletrodo de mercúrio, em tampão borato e pH 7,00, é controlado por difusão tanto na presença como na ausência de CAT. No entanto, para o processo de oxidação do zinco na presença e na ausência de CAT, a relação entre I e $v^{1/2}$ não foi linear, o que sugere um processo controlado por adsorção.

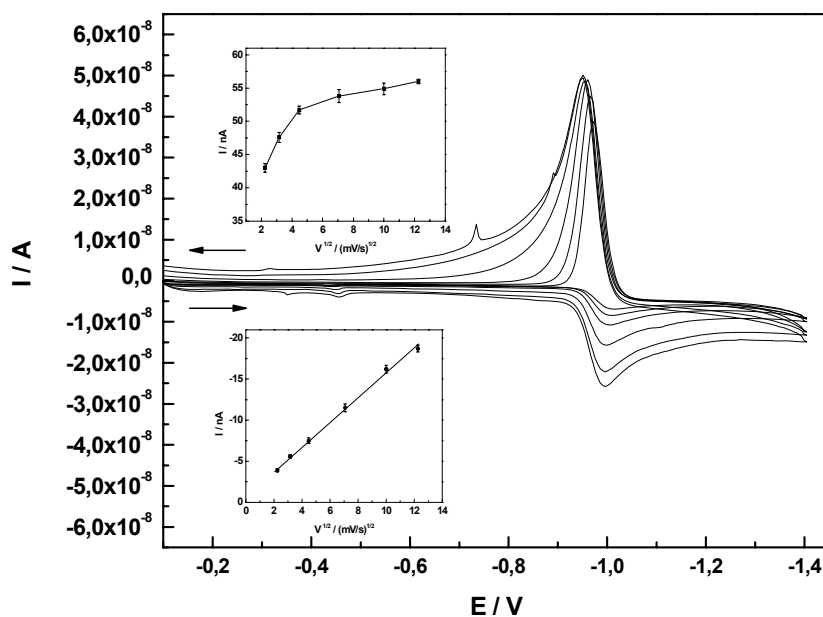


Figura 51. Voltamogramas cíclicos para 100 μ L de Zn^{2+} 1×10^{-3} mol L^{-1} em 10 mL de tampão borato $0,1$ mol L^{-1} pH 7,00. Velocidades de varredura = 5, 10, 20, 50, 100, 150 $mV s^{-1}$, $E_i = -0,1$ V, $E_w = -1,14$ V, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

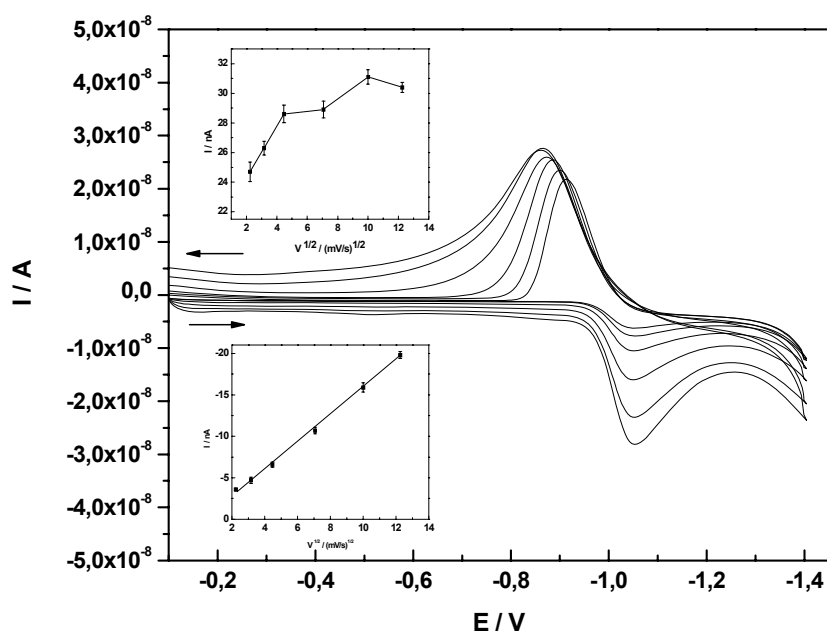


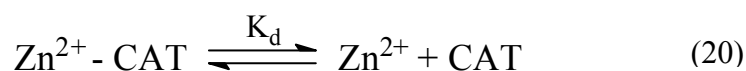
Figura 52. Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Zn^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00 na presença de 100 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Velocidades de varredura = 5, 10, 20, 50, 100, 150 mV s^{-1} , $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_w = -1,14 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Com base nos voltamogramas cíclicos obtidos para o complexo Zn^{2+} -CAT, pode-se concluir que o processo redox é quasi-reversível, pois neste caso observa-se os dois picos correspondentes aos processos de oxidação e redução na superfície do eletrodo, porém com diferenças entre os potenciais de redução e oxidação superiores a $0,059/n$ (Equação 13) e razões entre correntes de pico catódica e anódica diferentes de um (Equação 12). Conseqüentemente, o potencial de redução padrão não pode ser calculado pela Equação 11 e não é possível determinar o coeficiente de difusão do sistema pela Equação 19.

Utilizando a Equação 19 e a inclinação da reta obtida para o zinco na ausência de CAT (processo redox reversível), foi possível determinar o valor do coeficiente de difusão para o zinco ($0,42 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), em tampão borato e pH 7,00, valor este próximo ao encontrado na literatura ($0,70 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).¹⁴³

4.1.3 Cálculo da constante de dissociação (K_d) do complexo Zn^{2+} – CAT e do E^0

A reação de dissociação para um complexo formado entre o íon metálico Zn^{2+} e o ligante CAT, pode ser representada pela Equação 20.



$$K_d = \frac{[Zn^{2+}][CAT]}{[Zn^{2+} - CAT]} \quad (21)$$

Para o sistema Zn^{2+} – CAT estudado observou-se a formação de um complexo de estequiometria 20:1. A constante de estabilidade foi calculada pelo método de Saroff e Mark,¹⁴⁴ utilizando a seguinte equação:

$$\frac{(C_0 - C)}{P} = \frac{(K \cdot C \cdot n)}{(1 + K \cdot C)} \quad (22)$$

onde

C_0 = concentração do íon metálico total

C = concentração do metal livre no ponto de equivalência

P = concentração de peptídeo total

n = número de sítios de ligação do íon metálico

K = constante de associação da reação (constante de estabilidade)

Para o cálculo da constante de dissociação da reação de complexação do Zn^{2+} com a CAT (Equação 20), foram adotados os seguintes parâmetros experimentais (Tabela 26):

C_0 = concentração do Zn^{2+} total

C = concentração do Zn^{2+} livre no ponto de equivalência

P = concentração de CAT no ponto de equivalência

n = 20 (número de possíveis sítios de ligação do Zn^{2+} na CAT)

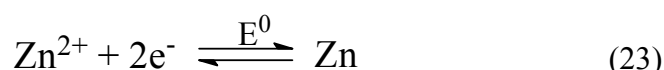
Tabela 26. Valores de K_d calculados para a interação Zn^{2+} – CAT utilizando o método de Saroff e Mark

Técnica	C_0 (mol L ⁻¹)	C (mol L ⁻¹)	P (mol L ⁻¹)	K_d (mol L ⁻¹)
DPASV	$9,80 \times 10^{-7}$	$8,96 \times 10^{-10}$	$4,96 \times 10^{-8}$	$1,62 \times 10^{-11}$
CV	$9,80 \times 10^{-6}$	$1,49 \times 10^{-8}$	$4,90 \times 10^{-7}$	$2,98 \times 10^{-11}$

Obs: Os valores de C_0 , C e P foram calculados por meio da estequiometria encontrada, calculada pelo P.E. médio das titulações amperométricas, utilizando as técnicas DPASV e CV.

Os valores da constante de dissociação atestam a grande estabilidade do complexo formado entre a CAT e o íon Zn^{2+} .

Utilizando os valores de K_d , pode-se calcular o valor do potencial padrão de redução (E^0) para o complexo Zn^{2+} – CAT. As reações eletroquímicas podem ser divididas em duas etapas, para um complexo formado entre a espécie eletroativa Zn^{2+} e a enzima CAT.



A equação de Nernst para a redução do Zn^{2+} (Equação 23) é representada por:

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log [Zn^{2+}] \quad (25)$$

Onde o E^0 é o potencial padrão de redução do Zn^{2+} (-0,76 V), medido em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio a 25 °C, tendo todas as espécies atividade unitária.

A equação de Nernst para a redução do Zn^{2+} na presença de CAT (Equação 24) é representada por:

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log \frac{[Zn^{2+} - CAT]}{[CAT]} \quad (26)$$

Onde o $E^{0'}$ é o potencial padrão de redução do Zn^{2+} na presença de CAT.

A relação de K_d e $E^{0'}$ (Equação 27) é obtida isolando e substituindo o termo $[Zn^{2+}]$ da equação 21 na equação 25, e em seguida igualando-se com a equação 26.

$$E^{0'} = E^0 + \frac{0,059}{2} \log K_d \quad (27)$$

Os valores de $E^{0'}$ (Tabela 27), foram calculados substituindo o valor de K_d e o valor de E^0 na equação 27 e em seguida convertendo para o eletrodo de referência utilizado (+ 0,22 V). Os valores de $E^{0'}$ obtidos foram semelhantes aos $E^{0'}$ observados nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial ($\sim -0,95$ V).

Tabela 27. Valores de potencial padrão de redução para o complexo Zn^{2+} – CAT

Técnica	K_d (mol L ⁻¹)	$E^{0'}$ (V)
DPASV	$1,62 \times 10^{-11}$	-0,85
CV	$2,98 \times 10^{-11}$	-0,85

A estequiometria, o K_d e o $E^{0'}$ determinados para o sistema Zn^{2+} – CAT são inéditos, pois estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. O valor de K_d indica a formação de um complexo bastante estável entre o Zn^{2+} e a CAT. Embora o zinco tenha uma atuação importante no combate à formação das ERO, como componente estrutural da SOD, o seu excesso no meio celular pode provocar a inibição da enzima catalase pela formação de um complexo estável, contribuindo desta maneira para o estresse oxidativo por meio do aumento do peróxido de hidrogênio no meio.

4.2 Sistema Cu^{2+} – CAT

4.2.1 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

A Figura 53 mostra os voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que a adição da CAT provoca o decaimento da corrente de oxidação do cobre, atestando a interação do íon Cu^{2+} com a CAT.

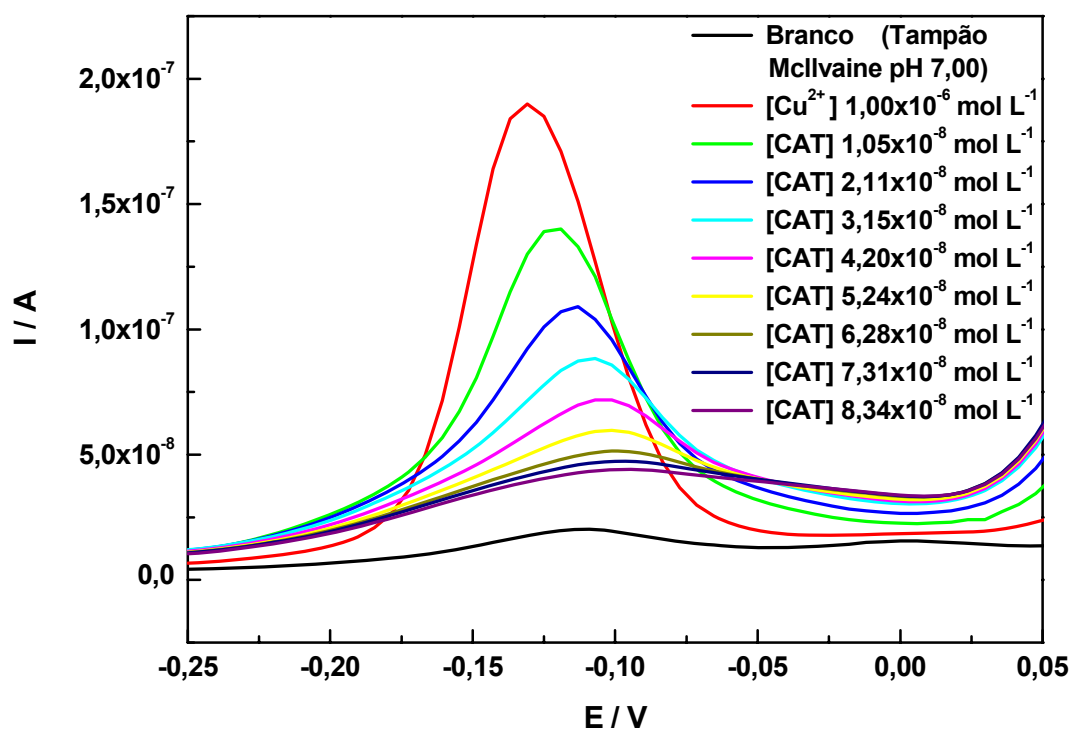


Figura 53. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $E_d = -0,25 \text{ V}$, $t_d = 60 \text{ s}$, $E_i = -0,25 \text{ V}$; $E_f = 0,05 \text{ V}$, $v = 0,06 \text{ V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

A curva de titulação amperométrica (Figura 54) foi obtida com base nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o íon Cu^{2+} na ausência e na presença de CAT. Por meio do ponto de equivalência da curva de titulação amperométrica, calculou-se a estequiometria do complexo (16 Cu^{2+} : 1 CAT).

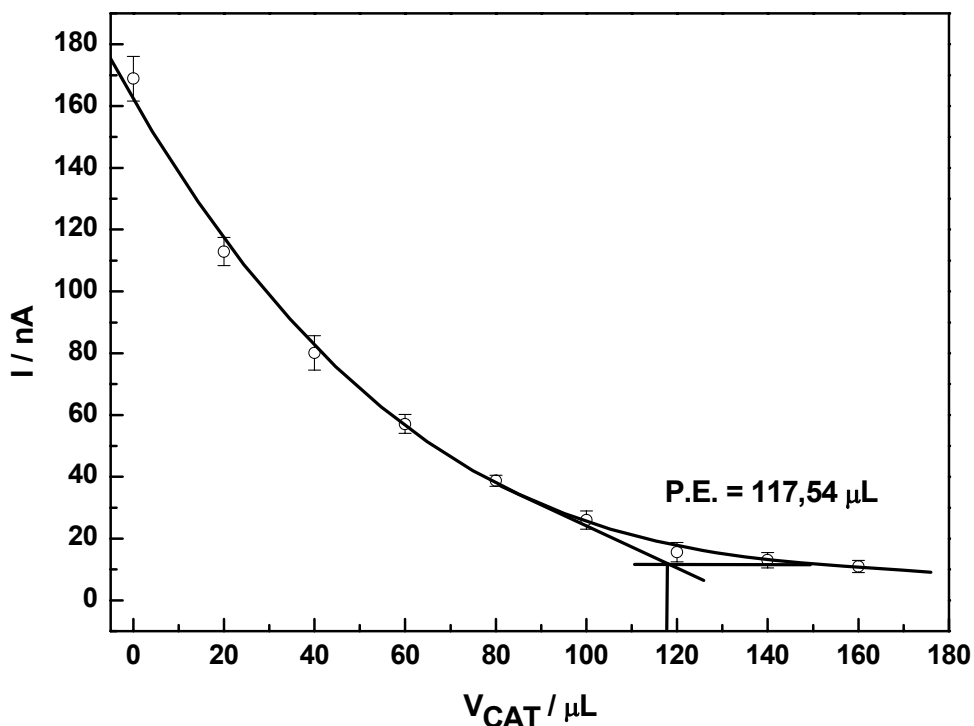


Figura 54. Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase. Adições sucessivas de 20 μL da solução de catalase $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($n_d = 3$ determinações).

4.2.2 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos obtidos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ são mostrados na Figura 55. Os decaimentos das correntes de oxidação e redução mostram a interação do íon Cu^{2+} com a CAT.

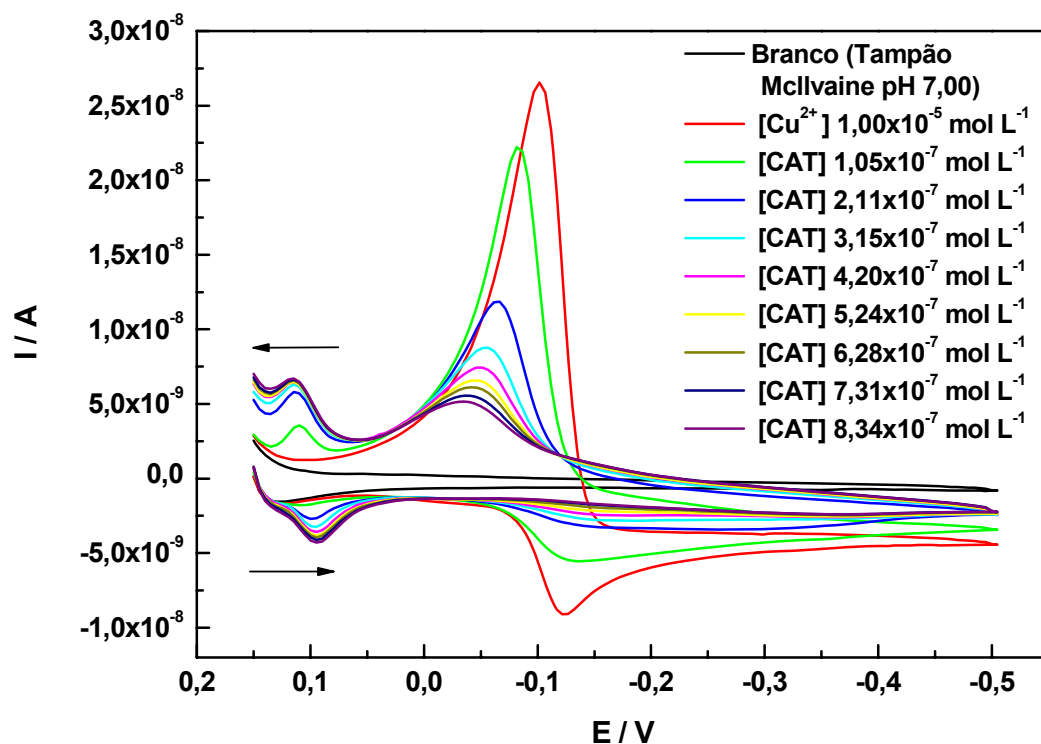


Figura 55. Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,15 \text{ V}$, $E_w = -0,5 \text{ V}$, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

A curva de titulação amperométrica (Figura 56) foi obtida com base nos voltamogramas cíclicos para o íon Cu^{2+} na ausência e na presença de CAT. A adição de 109,05 μL de CAT provoca o decaimento da corrente de oxidação do cobre até um valor próximo de zero. Este volume de CAT adicionado para complexar o Cu^{2+} foi utilizado para calcular a estequiometria do complexo ($16 \text{ Cu}^{2+} : 1 \text{ CAT}$). Nas técnicas de DPASV e CV, a estequiometria encontrada foi a mesma.

Nos voltamogramas cíclicos não foi possível observar o decaimento do pico de redução do cobre até um valor próximo de zero, portanto, experimentos utilizando a técnica de pulso diferencial foram realizados para verificar este decaimento da corrente de redução do cobre com a adição da CAT (sub-capítulo 4.2.3).

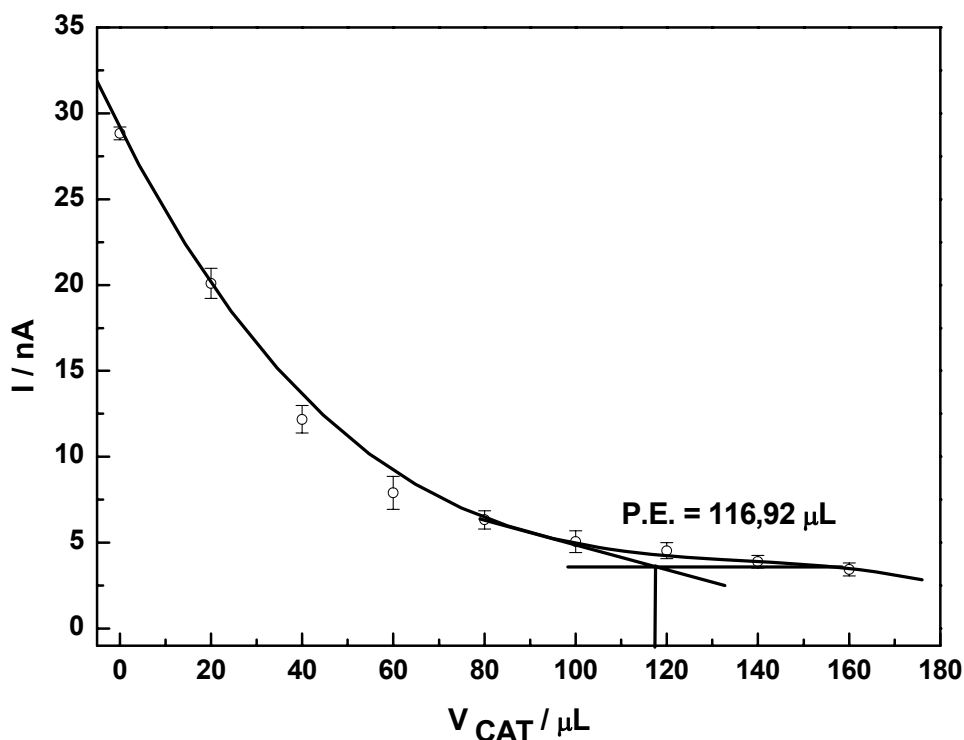


Figura 56. Curva de titulação amperométrica de 100 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00 com a catalase. Adições sucessivas de 20 μL da solução de catalase $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n_d = 3$ determinações).

O processo de oxidação-redução do cobre foi investigado por meio de curva I (corrente de oxidação) vs $v^{1/2}$ (raiz quadrada da velocidade de varredura). Como descrito pela equação de Randles-Sevcik (Equação 19), I_{pa} e I_{pc} aumentam com $v^{1/2}$.

Por meio das curvas da Figura 57, pode-se dizer que o processo de redução do cobre na superfície do eletrodo de mercúrio, em tampão McIlvaine pH 7,00, é controlado por difusão na ausência de CAT, e o processo de oxidação do cobre na ausência de CAT é um processo adsorptivo. Na presença de CAT não foi possível determinar se os processos de oxidação e redução do cobre na superfície do eletrodo de mercúrio são controlados por difusão ou adsorção, e afirmar se o processo redox é reversível, quasi-reversível ou irreversível, pois não foram observados picos de oxidação e redução bem definidos nos voltamogramas (Figura 58).

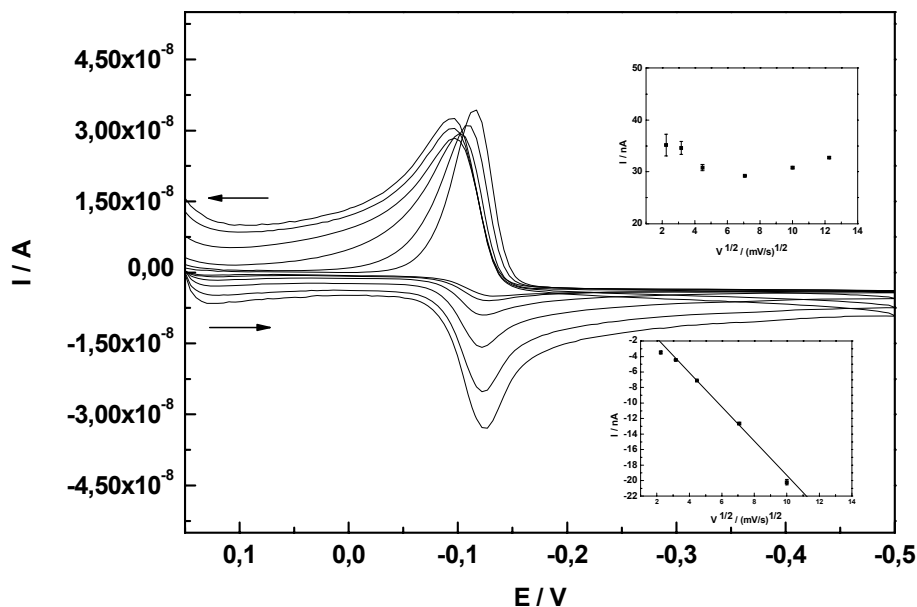


Figura 57. Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} 1×10^{-3} mol L^{-1} em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00. Velocidades de varredura = 5, 10, 20, 50, 100, 150 mV s^{-1} , $E_i = 0,15$ V, $E_w = -0,5$ V, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

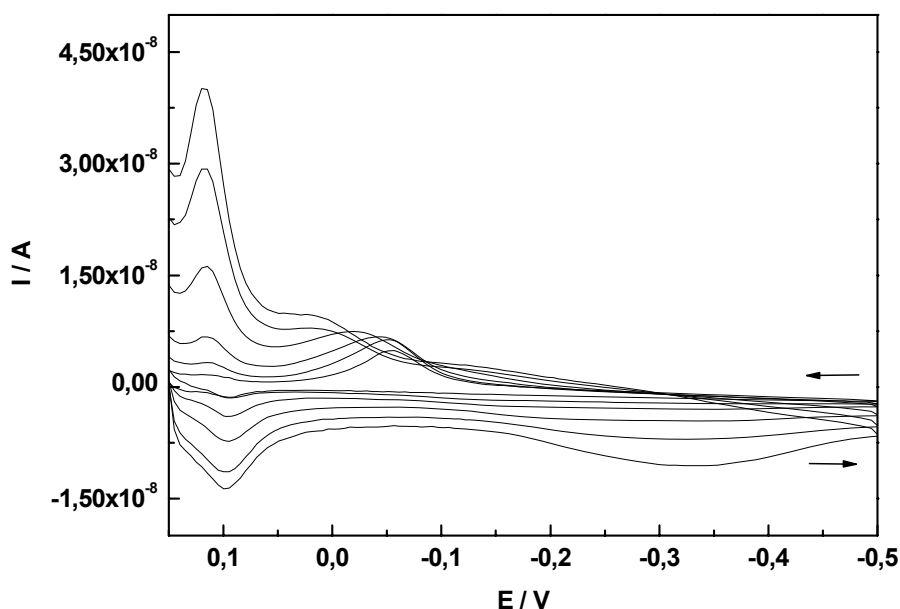


Figura 58. Voltamogramas cíclicos para 100 μL de Cu^{2+} 1×10^{-3} mol L^{-1} em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00 na presença de 100 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Velocidades de varredura = 5, 10, 20, 50, 100, 150 mV s^{-1} , $E_i = 0,15$ V, $E_w = -0,5$ V, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Utilizando a Equação 19 e a inclinação da reta obtida para o cobre na ausência de CAT (processo redox reversível), foi possível determinar o valor do coeficiente de difusão para o cobre ($0,95 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), em tampão McIlvaine e pH 7,00, valor este próximo ao encontrado na literatura ($0,71 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).¹⁴³

4.2.3 Estudo da interação do íon Cu^{2+} com a CAT por voltametria de pulso diferencial

Nos voltamogramas cíclicos para o Cu^{2+} com adições sucessivas de CAT (Figura 55), observou-se que a adição de 60 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ provocou o desaparecimento completo do pico de redução do metal, este valor não é coincidente com o volume de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (109,05 μL) que provocou o desaparecimento do pico de oxidação do metal até um valor próximo de zero. Portanto, para o sistema Cu^{2+} – CAT foi necessário utilizar a técnica de pulso diferencial para verificar o decaimento da corrente de redução do cobre com a adição da CAT, e confirmar a estequiometria encontrada para o complexo com o uso das técnicas DPASV e CV.

A Figura 59 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para 50 μL de Cu^{2+} $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Nota-se que a adição da CAT provoca o decaimento da corrente de redução do cobre até um valor próximo de zero, evidenciando a interação do íon Cu^{2+} com a CAT.

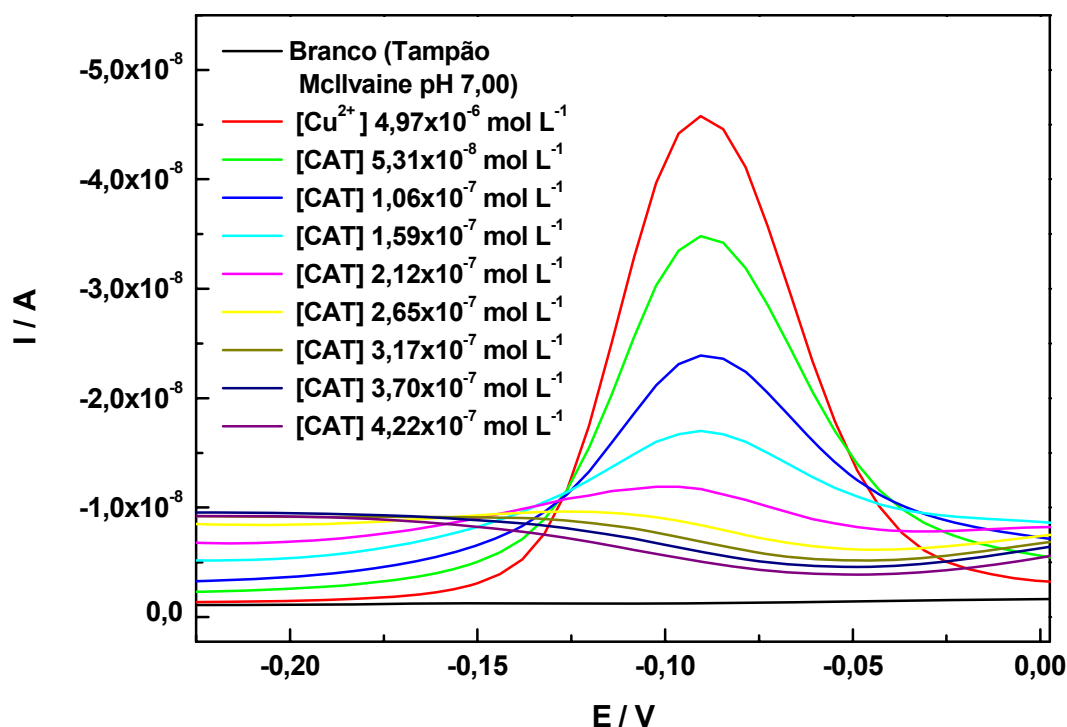


Figura 59. Voltamogramas de pulso diferencial para 50 μL de Cu^{2+} 1×10^{-3} mol L^{-1} em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 10 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . $E_i = -0,25\text{V}$; $E_f = 0,05$ V, $v = 0,06$ V s^{-1} , Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

A curva de titulação amperométrica (Figura 60) foi obtida com base nos voltamogramas de pulso diferencial para o íon Cu^{2+} na ausência e na presença de CAT. Por meio do ponto de equivalência da curva de titulação amperométrica, calculou-se a estequiometria do complexo (16 Cu^{2+} : 1 CAT), sendo coincidente com os valores obtidos pelas técnicas de DPASV e CV. A estequiometria encontrada para o complexo, por meio das técnicas voltamétricas, possui um valor bem próximo do número de possíveis sítios de ligação encontrados para o cobre na catalase no estudo teórico (seis possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} por monômero na estrutura da catalase; total: 24). A pequena diferença pode ser atribuída ao tamanho da enzima, à sua conformação na superfície do eletrodo e ao pH do meio, que juntos

ou individualmente podem ter contribuído para que alguns sítios de ligação, identificados no estudo teórico (Figura 61), tenham se tornado impedidos estericamente de fazerem ligações com íons metálicos, embora tenham sido considerados candidatos nas análises visuais realizadas utilizando o software RasMol. São necessários, portanto, estudos teóricos mais refinados para que as condições experimentais de ligação sejam o mais fielmente reproduzidas.

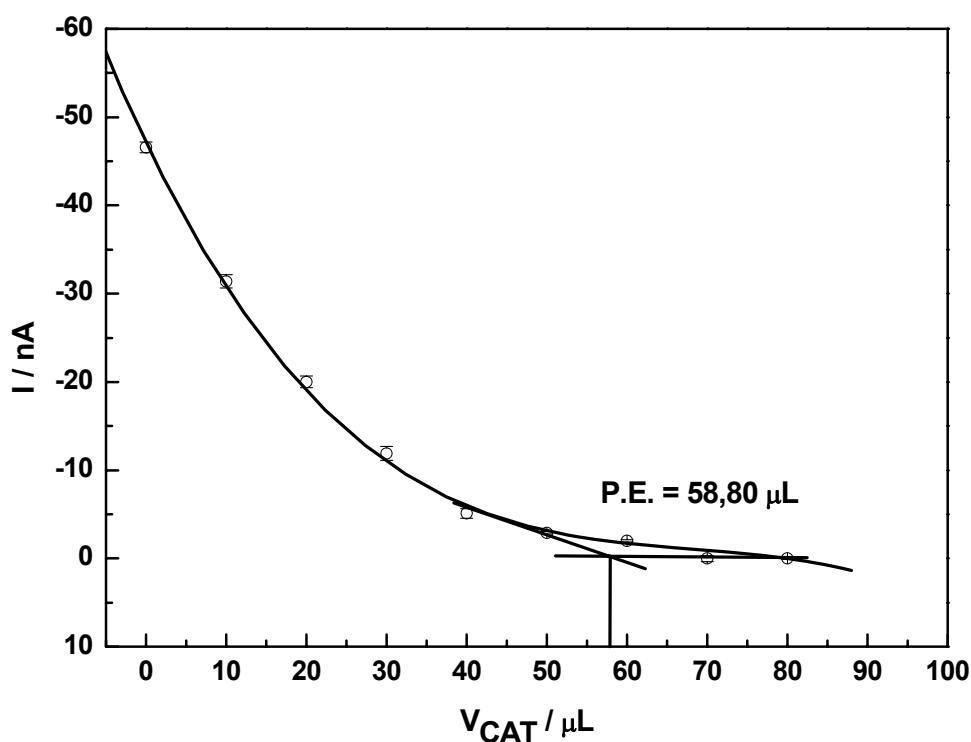


Figura 60. Curva de titulação amperométrica de 50 μL de $Cu^{2+} 1 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00 com a catalase. Adições sucessivas de 10 μL da solução de catalase $5,35 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ ($n_d = 3$ determinações).

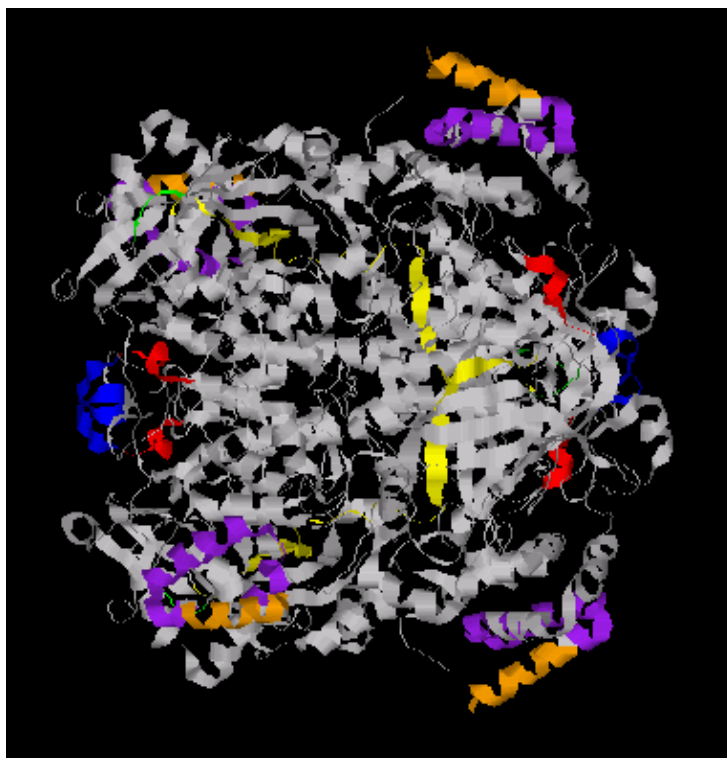
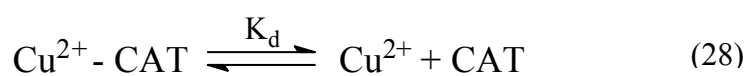


Figura 61. Localização dos possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} na estrutura da catalase identificados no estudo teórico.

4.2.4 Cálculo da constante de dissociação (K_d) do complexo Cu^{2+} – CAT e do E^0 ,

A reação de dissociação para um complexo formado entre o íon metálico Cu^{2+} e um ligante (CAT), pode ser representada pela Equação 28.



$$K_d = \frac{[\text{Cu}^{2+}][\text{CAT}]}{[\text{Cu}^{2+} - \text{CAT}]} \quad (29)$$

Para o sistema Cu^{2+} – CAT estudado observou-se a formação de um complexo de estequiometria 16:1 e a constante de estabilidade foi calculada pelo método de Saroff e Mark (Equação 22), adotando os seguintes parâmetros experimentais (Tabela 28):

C_0 = concentração do Cu^{2+} total

C = concentração do Cu^{2+} livre no ponto de equivalência

P = concentração de CAT no ponto de equivalência

$n = 16$ (número de possíveis sítios de ligação do Cu^{2+} na CAT)

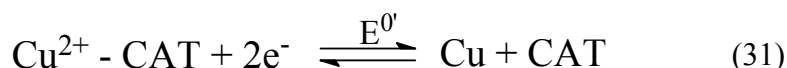
Tabela 28. Valores de K_d calculados para a interação Cu^{2+} – CAT utilizando o método de Saroff e Mark

Técnica	C_0 (mol L ⁻¹)	C (mol L ⁻¹)	P (mol L ⁻¹)	K_d (mol L ⁻¹)
DPASV	$9,88 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-8}$	$6,21 \times 10^{-8}$	$1,73 \times 10^{-10}$
CV	$9,88 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-7}$	$6,12 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-10}$
DPV	$4,94 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-8}$	$3,09 \times 10^{-7}$	$1,81 \times 10^{-10}$

Obs: Os valores de C_0 , C e P foram calculados por meio da estequiometria encontrada, calculada pelo P.E. médio das titulações amperométricas, utilizando as técnicas DPASV, CV e DP.

Os valores da constante de dissociação indicam a grande estabilidade do complexo formado entre a CAT e o cobre.

As reações eletroquímicas podem ser divididas em duas etapas, para um complexo formado entre a espécie eletroativa Cu^{2+} e a enzima CAT.



Os valores de $E^{0'}$ (Tabela 29), foram calculados substituindo o valor de K_d e o valor de E^0 (+ 0,34 V) na equação 27 e em seguida convertendo para o eletrodo de referência utilizado (+ 0,22 V). Os valores de $E^{0'}$ calculados encontram-se fora do domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio, portanto justificam a ausência do sinal característico do complexo Cu^{2+} – CAT nos voltamogramas obtidos.

Tabela 29. Valores de potencial padrão de redução para o complexo Cu^{2+} – CAT

Técnica	K_d (mol L ⁻¹)	$E^{0'}$ (V)
DPASV	$1,73 \times 10^{-10}$	+ 0,27
CV	$1,25 \times 10^{-10}$	+ 0,27
DPV	$1,81 \times 10^{-10}$	+ 0,27

A estequiometria, o K_d e o $E^{0'}$ determinados para o sistema Cu^{2+} – CAT também são inéditos, ou seja, estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. O valor de K_d indica a formação de um complexo bastante estável entre o Cu^{2+} e a CAT, sugerindo a participação do cobre na redução da atividade da enzima catalase, dependendo de sua concentração no meio celular, por meio da formação de um complexo estável.

4.3 Sistemas Cd^{2+} – CAT e Pb^{2+} – CAT

Os voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para os sistemas Cd^{2+} – CAT e Pb^{2+} – CAT são mostrados nas Figuras 62 e 63, respectivamente.

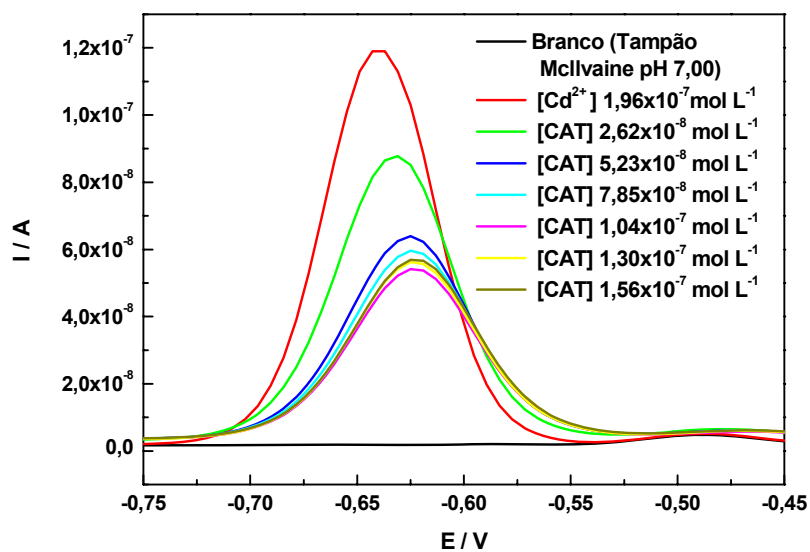


Figura 62. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para $200 \mu\text{L}$ de $\text{Cd}^{2+} 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine $\text{pH} = 7,00$ com adições de $5 \mu\text{L}$ de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_d = -0,75 \text{ V}$, $t_d = 60 \text{ s}$, $E_i = -0,75 \text{ V}$, $E_f = -0,45 \text{ V}$, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

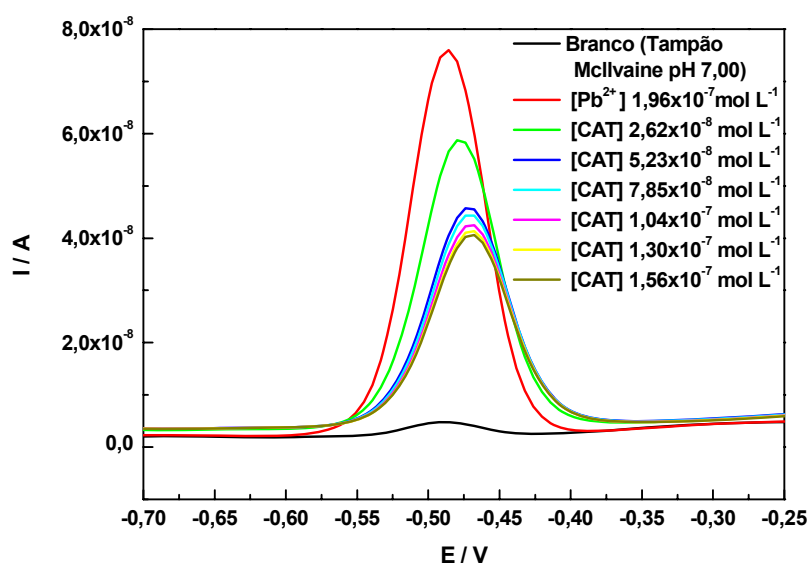


Figura 63. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 200 μL de Pb^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com adições de 5 μL de CAT $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 60 \text{ s}$, $E_i = -0,70 \text{ V}$, $E_f = -0,25 \text{ V}$, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

As curvas de titulação amperométrica (Figura 64) foram obtidas separadamente com base nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para os íons Cd^{2+} e Pb^{2+} na ausência e na presença de CAT. A adição de 13,16 μL e 12,54 μL de CAT provoca o decaimento da corrente de oxidação do cádmio e do chumbo respectivamente; no entanto, as correntes não foram eliminadas completamente. Estes volumes de CAT adicionados para complexar o Cd^{2+} e o Pb^{2+} foram utilizados para calcular uma suposta estequiometria dos complexos (3 Cd^{2+} : 1 CAT e 3 Pb^{2+} : 1 CAT). Apesar das correntes de oxidação do cádmio e do chumbo não terem decaído até um valor próximo de zero, a suposta estequiometria encontrada, por meio da técnica de DPASV, é muito semelhante ao valor de possíveis sítios identificados no estudo teórico (um possível sítio de ligação dos íons Cd^{2+} e Pb^{2+} por monômero na estrutura da catalase; total: 4).

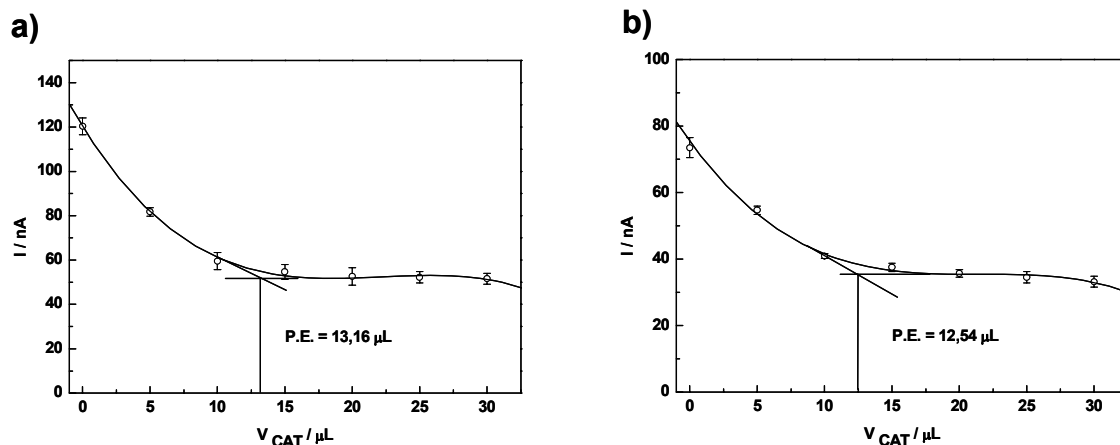


Figura 64. Curvas de titulação amperométrica: a) 200 μL de Cd^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase. b) 200 μL de Pb^{2+} $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00 com a catalase. Adições sucessivas de 20 μL da solução de catalase $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n_d = 3$ determinações).

Para os sistemas $\text{Cd}^{2+} - \text{CAT}$ e $\text{Pb}^{2+} - \text{CAT}$ não foi possível determinar a estequiometria e a constante de dissociação, pois em pH = 7,00, observou-se que a complexação destes íons pela catalase não era favorecida. Com base nesses dados, outros estudos foram realizados com diferentes eletrólitos (Tampão borato, KNO_3 , Trizma HCl e HEPES), valores de pH (4 a 9) e concentrações dos metais e da catalase (1×10^{-4} a 1×10^{-6}), porém nos diversos ensaios realizados os resultados não foram coincidentes, portanto não conclusivos em relação a formação dos complexos $\text{Cd}^{2+} - \text{CAT}$ e $\text{Pb}^{2+} - \text{CAT}$. Foi observado um decaimento da corrente de oxidação dos metais com a adição de CAT, porém pouco expressivo (a corrente não foi eliminada completamente), o que nos leva às seguintes hipóteses: os sítios de ligação para esses metais já estão ocupados; há impedimento estérico para as ligações; a interação não é estável; ou a concentração dos metais no meio não favorece a formação dos complexos com a catalase.

VI – CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, podemos chegar às seguintes conclusões:

1. Por meio da metodologia adotada no estudo teórico, foi possível identificar na estrutura da catalase os possíveis sítios de ligação dos íons metálicos Zn^{2+} (28 possíveis sítios de ligação), Cu^{2+} (24 possíveis sítios de ligação), Cd^{2+} (4 possíveis sítios de ligação) e Pb^{2+} (4 possíveis sítios de ligação), levando em consideração os resíduos com maior afinidade pelos metais (histidina e cisteína) e de possível impedimento estérico. No entanto, o estudo teórico foi apenas uma ferramenta para indicar os possíveis sítios de ligações de íons metálicos na estrutura da catalase, sendo necessário um estudo experimental para confirmar ou não as predições teóricas;
2. A catalase forma um complexo com íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , os quais foram evidenciados pelo decaimento das correntes de oxidação e redução do zinco e do cobre na presença de catalase;
3. Para o complexo Zn^{2+} – CAT, a estequiometria é de vinte mols de zinco para um mol de catalase, cujo valor está bem próximo do número de possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} identificados no estudo teórico. A pequena diferença pode ser atribuída ao tamanho da enzima, à sua conformação na superfície do eletrodo e ao pH do meio, que juntos ou individualmente podem ter contribuído para que alguns sítios de ligação, identificados no estudo teórico, tenham se tornado impedidos estericamente de fazerem ligações com íons metálicos. A estequiometria encontrada para o complexo Zn^{2+} – CAT, utilizando as técnicas voltamétricas DPASV e CV, foram coincidentes. O valor da constante de dissociação ($1,62 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ - DPASV; $2,98 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ - CV) indica a formação de um complexo estável entre a CAT e o íon Zn^{2+} . Estes dados são inéditos na literatura e sugerem a participação do zinco na inibição da enzima catalase pela formação de um complexo estável, contribuindo desta maneira para o estresse oxidativo;

4. Para o complexo Cu^{2+} – CAT, a estequiometria é de dezesseis mols de cobre para um mol de catalase, cujo valor está bem próximo do número de possíveis sítios de ligação do íon Cu^{2+} identificados no estudo teórico. A pequena diferença pode ser atribuída ao tamanho da enzima, à sua conformação na superfície do eletrodo e ao pH do meio, que juntos ou individualmente podem ter contribuído para que alguns sítios de ligação, identificados no estudo teórico, tenham se tornado impedidos estericamente de fazerem ligações com íons metálicos. A estequiometria encontrada para o complexo Cu^{2+} – CAT, por meio das técnicas voltamétricas DPASV, CV e DPV, foram coincidentes. O valor da constante de dissociação ($1,73 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPASV; $1,25 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - CV e $1,81 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ - DPV) indica a formação de um complexo estável entre a CAT e o íon Cu^{2+} . Estes dados são inéditos na literatura e sugerem a participação do cobre na indução do estresse oxidativo pela inibição da enzima catalase, por meio da formação de um complexo estável, dependendo de sua concentração no meio celular;
5. Os valores de $E^{0'}$ observados nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial ($\sim -0,95 \text{ V}$) foram semelhantes aos valores de $E^{0'}$ calculados para o complexo Zn^{2+} – CAT ($-0,85 \text{ V}$) a partir do K_d . Os valores de $E^{0'}$ calculados para o complexo Cu^{2+} – CAT ($+ 0,27 \text{ V}$) a partir do K_d encontram-se fora do domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio, justificando a ausência do sinal característico do complexo nos voltamogramas obtidos.
6. Por meio das curvas I (corrente) vs $v^{1/2}$ (raiz quadrada da velocidade de varredura) pode-se dizer que o processo de redução do zinco na superfície do eletrodo de mercúrio, em tampão borato e pH 7,00, é controlado por difusão tanto na presença como na ausência de CAT ($D = 0,42 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, para o zinco na ausência de catalase, valor próximo ao encontrado na literatura) e o processo de oxidação do zinco, na presença e na ausência de CAT, é adsortivo. Com base nos voltamogramas cíclicos obtidos para o complexo Zn^{2+} – CAT, pode-se concluir que o processo redox é quasi-reversível. O processo de redução do cobre na superfície do eletrodo de mercúrio, na ausência de CAT em tampão McIlvaine pH 7,00, é difusional ($D = 0,95 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, valor próximo ao encontrado na literatura) e o processo de oxidação do cobre é adsortivo. Na presença de CAT não foi possível determinar se os processos de oxidação e redução do cobre na superfície do eletrodo de

mercúrio são controlados por difusão ou adsorção, e afirmar se o processo redox é reversível, quasi-reversível ou irreversível, pois não foram observados picos de oxidação e redução bem definidos nos voltamogramas

7. Para os sistemas Cd^{2+} – CAT e Pb^{2+} – CAT não foi possível determinar a estequiometria e a constante de dissociação. Foi observado um decaimento da corrente de oxidação do cádmio e do chumbo com a adição de CAT, porém pouco expressivo (as correntes não foram eliminadas completamente), o que leva às seguintes hipóteses: os sítios de ligação para esses metais já estão ocupados, há impedimento estérico para as ligações, a interação não é estável, ou a concentração dos metais no meio não favorece a formação dos complexos com a catalase. Embora as correntes de oxidação do cádmio e do chumbo não terem decaído até um valor próximo de zero, a suposta estequiometria encontrada para estes complexos (3 Cd^{2+} : 1 CAT e 3 Pb^{2+} : 1 CAT), por meio da técnica de DPASV, é muito semelhante ao valor de possíveis sítios identificados no estudo teórico.
8. As técnicas voltamétricas devido a sua sensibilidade, reprodutibilidade, reprodução de um meio fisiológico e a obtenção direta de dados quantitativos, as tornam uma importante ferramenta para o estudo da interação de íons metálicos com enzimas.

VII – ETAPAS POSTERIORES

Pode-se propor como etapa posterior, a síntese dos peptídeos identificados como sendo os possíveis sítios de ligação na estrutura da catalase (tabela 25) para um estudo da interação dos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} com estes fragmentos peptídicos sintéticos, com o objetivo de confirmar ou não a complexação de íons metálicos com os sítios indicados pelo estudo teórico.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.; *Chem.-Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1.
2. Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G.; *Rev. Nutr.* **1999**, *12*, 123.
3. Barreiros, A.L.B.S.; David, J. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113.
4. Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S.; *Rev. Ass. Med. Brasil* **1997**, *43*, 61.
5. Andrade, D.R.J.; Souza, R.B.; Santos, A.S.; Andrade, D.R.; *J. Bras. Pneumol.* **2005**, *31*, 60.
6. Berra, C.M.; Menck, C.F.M.; Mascio, P.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1340.
7. Leornad, S.S.; Harris, K.; Shi, X.; *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *12*, 1921.
8. Masarwa, M.; Cohen, H.; Meyerstein, D.; Hickman, D.; Bakac, A.; Espenson, J. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4293.
9. Bal, W.; Kasprzak, K.S.; *Toxicol. Lett.* **2002**, *127*, 55.
10. Sies, H.; *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 213.
11. Cerqueira, F.M.; Medeiros, M.H.G.; Augusto, O.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 441.
12. Barbosa, L.F.; Medeiros, M.H.G.; Augusto, O.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1352.
13. Rahman, I.; Biswas, S.; Kode, A.; *Eur. J. of Pharmacol.* **2006**, *533*, 222.
14. Nicholls, P.; Fita, I.; Loewen, P.C.; *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, *51*, 51.
15. Zámocký, M.; Koller, F.; *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **1999**, *72*, 19.
16. Djordjevic, V.B.; *International Review of Cytology* **2004**, *237*, 57.
17. Wang, X.; Li, S.; Jiang, Y.; *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6479.
18. Jones, P.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13791.
19. Lippard, S.J.; Berg, J.; *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books: Mill Valley, 1994.
20. Stohs, S.J.; Bagghi, D.; *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 32.
21. Valko, M.; Morris, h.; Cronin, M. T. D.; *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161.

22. Hartley, A.; Cooper J. M.; Schapira A. H. V.; *Brain Res.* **1993**, 627, 349.
23. Gaetke, L. M.; Chow, C. K.; *Toxicology* **2003**, 189, 147.
24. Honda K.; Casadesus G.; Petersen R.B.; Perry G.; Smith M.A. *Annals of the new York Academy of Sciences* **2004**, 1012, 179.
25. Drazkiewicz, M.; Skorzynska-Polit, E. S.; Krupa, Z.; *Springer Netherlands* **2004**, 17, 379.
26. Marchlewicz, M.; Michalska, T.; Wiszniewska, B.; *Chemospher* **2004**, 57, 1553.
27. Fatima, R.A.; Ahmad, M.; *Sci. Total Environ.* **2005**, 346, 256.
28. Schützendübel, A.; Nikolova, P.; Rudolf, C.; Polle A.; *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, 40, 577.
29. Huang, Y. H.; Shih, C.M.; Huang, C.J.; Lin, C.M.; Chou, C.M.; Tsai, M.L.; Liu, T.P.; Chiu, J.F.; Chen, C.T.; *J. Cell. Biochem.* **2006**, 98, 577.
30. Casalino, E.; Calzaretti, G.; Sblano, C.; Landriscina, C.; *Toxicology* **2002**, 179, 37.
31. Ikediobi, C. O.; Badisa, V. L.; Ayuk-Takem, L.T.; Latinwo, L. M.; West, J.; *Internacional Journal of Molecular Medicine* **2004**, 14, 87.
32. Atli, G.; Alptekin, O.; Tükel, S.; Canli, M.; *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, 143, 218.
33. Gurd, F. R.N.; Wilcox, P.E.; *Adv. Protein Chem.* **1956**, 48, 311.
34. Sigel, H.; Martin, R.B.; *Chem. Rev.* **1982**, 82, 385.
35. Chow, E.; Gooding, J.J.; *Electroanalysis* **2006**, 15, 1437.
36. Gooding, J.J.; Hibbert, D.B.; Yang, W.R.; *Sensors* **2001**, 1, 75.
37. Hay, R.W.; Hassan, M.M.; Chen, Y.Q.; *J. Inorg. Biochem.* **1993**, 52, 17.
38. Edsall, J.T.; Felsenfeld, G.; Goodman, D.S.; Gurd, F.R.N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3054.
39. Kozłowski, H.; Kowalik-Jankowska, T.; Jeżowska-Bojczuk, M.; *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 2323.
40. Sangi, M.R.; Jayatissa, D.; Kim, J.P.; Hunter, K.A.; *Talanta* **2004**, 62, 924.
41. Valee, B. L.; *Adv Protein Chem.* **1955**, 10, 317.
42. Hirata, K.; Tsuji, N.; Miyamoto, K.; *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 593.

43. Satofuka, H.; Fukui, T.; Takagi, M.; Atomi, H.; Imanaka, T.; *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 595.
44. Mendoza - Cózatl, D. G.; Rodríguez - Zavala, J. S.; Rodríguez - Enríquez, S.; Mendoza-Hernandez, G.; Briones-Gallardo, R.; Moreno-Sánchez, R.; *FEBS J.* **2006**, *273*, 5703.
45. Cobbett, C.; Goldsbrough, P.; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 159.
46. Polec-Pawlak, K.; Ruzik, R.; Lipiec, E.; *Talanta* **2007**, *72*, 1564.
47. Gelinsky, M.; Vogler, R.; Vahrenkamp, H.; *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *334*, 230.
48. Burford, N.; Eelman, M. D.; Groom, K.; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1992.
49. Wei, H.; Luo, X.; Wu, Y.; Yao, Y.; Guo, Z.; Zhu, L.; *Dalton Trans.* **2000**, 4196.
50. Liu, D.; Seuthe, A. B.; Ehrler, O. T.; Zhang, X.; Wyttenbach, T.; Hsu, J. F.; Bowers, M. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2024.
51. Todorova-Balvay, D.; Simon, S.; Créminon, C.; Grassi, J.; Srikrishnan, T.; Vijayalakshmi, M. A.; *J. of Chromatogr., B* **2005**, *818*, 75.
52. Józszai, V.; Nagy, Z.; Osz, K.; Sanna, D.; Di Natale, G.; La Mendola, D.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I.; *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1399.
53. Bonomo, R. P.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Santoro, A. M.; Tabbì, G.; Vagliasindi, L. I.; *Dalton Trans.* **2007**, 1400.
54. Chan, J.; Huang, Z.; Merrifield, M.E.; Salgado, M.T.; Stillman, M.J.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233-234*, 319.
55. Penkowa, M.; *FEBS J.* **2006**, *273*, 1857.
56. Henkel, G.; Krebs, B.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 801.
57. Romero-Isart, N.; VasaK, M.; *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 388.
58. Dhanasekaran, M.; Negi, Shigeru; Sugiura, Y.; *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 45.
59. McColl, D.J.; Honchell, C.D.; Frankel, A.D.; *Biochemistry* **1999**, *96*, 9521.
60. Predki, P. F.; Harford, C.; Brar, P.; Sarkar, B.; *Biochem. J.* **1992**, *287*, 211.
61. Bal, W.; Christodoulou, J.; Sadler, P.J.; Tucker, A.; *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 33.
62. Martins E.O.; Drakenberg, T., *Inorg. Chim. Acta* **1982**, *67*, 71.

63. Goumakos, W.; Laussac, J.-P.; Sarkar, B.; *Biochem. Cell Biol.* **1991**, *69*, 809.
64. Giroux, E.; Schoun, J.; *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *14*, 359.
65. Rao, M.S.N; Lal, H.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3226.
66. Shriver, D.; Atkins, Peter, *Química Inorgânica*, Bookman: Porto Alegre, 2003.
67. Wilkins, P.C.; Wilkins, R.G.; *Inorganic Chemistry in Biology*, Oxford: New york, 1997.
68. Szilágyi, I.; Labádi, I.; Hernadi, K.; Pálíno, I.; Nagy, N.V.; Korecz, L.; Rockenbauer, A.; Kele, Z.; Kiss, T.; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1619.
69. Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
70. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2001.
71. Zuman, P.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 281.
72. Ewing, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análise Química*, Edgard Blücher: São Paulo, 1972.
73. Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K.; *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002.
74. Souza, D.; Machado, S. A. A.; Avaca, L. A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81.
75. Christie, J. H.; Turner, J.A.; Osteryoung, R. A.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1899.
76. Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electroquímica, Princípios, Métodos, e Aplicações*, Almedina: Coimbra, 1996.
77. Bard, J.A.; Faulkner, L.R.; *Electrochemical methods: fundamentals and application*, 2ª ed., John Wiley: New york, 2001
78. Kessinger, P.T.; Heineman, W.R.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 702.
79. Mabbott, G. A.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 697.
80. Niki, K.; Yagi, T.; Inokuchi, H.; Kimura, K.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 335.
81. Niki, K.; Yagi, T.; Inokuchi, H.; *ACS Advances in Chemistry* **1982**, *201*, 199.
82. Niki, K.; Kawasaki, Y.; Kimura, Y.; Higuchiy, Y.; Yasuoka, N.; *Langmuir* **1987**, *3*, 982.
83. Eddowes, M.J.; Hill, H.A.O.; *Journal of Chemical Society Communications* **1977**, *64*, 771.

84. Eddowes, M.J.; Hill, H.A.O.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, *104*, 4461.
85. Armstrong, F.A.; Lanon, A.M.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7211.
86. Johnson, D.L.; Lewis, B.C.; Elliot, D.J.; Miners, J.O., Martin, L.L.; *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1533.
87. Armstrong, F.A.; Hill, H.A.O.; Oliver, B.N.; Whitford, D.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1473.
88. Armstrong, F.A.; George, S.J.; Thomson, A.J.; Yates, M.G.; *FEBS Letters* **1988**, *234*, 107.
89. Armstrong, F.A.; Brown, K.J.; *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *219*, 319.
90. Dhesi, R.; Cotton, T.M.; Timkovich, R.; *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *154*, 129.
91. Andolfi, L.; Bruce, D.; Cannistraro, S.; Canters, G.W.; Daris, J.J.; Hill, H.A.O.; Crozier, J.; Verbeet, M. P.; Wrathmell, C.L.; Astier, Y.; *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *565*, 21.
92. McEvoy, J.P.; Foord, J.S.; *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 2933.
93. Castro, C. S. P.; Souza, J.R.; Bloch, C. J.; *Ciência e Cultura*, **2001**, *53*, 88.
94. Castro, C. S. P.; Souza, J.R.; Bloch, C. J.; *Protein Peptide Lett.* **2003**, *10*, 155.
95. Vidal, J.C.; Cepria, G.; Castillo, J.R.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *259*, 129.
96. Castro, C. S. P.; Souza, J.R.; Bloch, C. J.; *Protein Peptide Lett.* **2002**, *9*, 45.
97. Scarano, G.; Morelli, E.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 39.
98. Cruz-Vásques, B.H.; Díaz-Cruz, J.M.; Sestakova, I.; Velek, J.; Ariño, C.; Esteban, M.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *520*, 111.
99. Cruz-Vásques, B.H.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 778.
100. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.; *Talanta* **2007**, *71*, 344.
101. Mendieta, J.; Chivot, J.; Muñoz, A.; Rodríguez, A.R.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 663.
102. Muñoz, A.; Rodríguez, A.R.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 670.
103. Mendieta, J.; Rodríguez, A.R.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 473.
104. Nieto, O.; Rodríguez, A.R.; *Electroanalysis* **1999**, *11*, 175.

105. Díaz-Cruz, M.S.; Mendieta, J.; Monjonell, A.; Tauler, R.; Esteban, M.; *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 91.
106. Díaz-Cruz, M.S.; Mendieta, J.; Tauler, R.; Esteban, M.; *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *66*, 29.
107. Díaz-Cruz, M.S.; Mendieta, J.; Tauler, R.; Esteban, M.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4629.
108. Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J.M.; Díaz-Cruz, M.S.; Ariño, C.; Esteban, M.; Tauler, R.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *516*, 110.
109. Filho, W. O. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 2006.
110. Di, J.; Zhang, M.; Yao, K.; Bi, S.; *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 247.
111. Varma, S.; Mattiasson, B.; *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 172.
112. Li, M.; He, P.; Zhang, Y.; Hu, N.; *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1749*, 43.
113. Salimi, A.; Noorbakhsh, A.; Ghadermarz, M.; *Anal. Biochem.* **2005**, *344*, 16.
114. Varma, S.; Mitra, C. K.; *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 151
115. Edelhoch, H.; *Biochemistry* **1967**, *7*, 1948.
116. Murphy, J.B.; Kies, M.W.; *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 382.
117. Schechter, I.; Berger, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157.
118. Schechter, I.; Berger, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *32*, 898.
119. Katherine, L.B.; Lally, J. M.; Martin, S.R.; O'Reilly, N. J.; Solomons, E.; Freemont, P.S.; *Biochemistry* **1996**, *93*, 1601.
120. Yang, D.S.; McLaurin, J.; Qin, K.; Westaway, D.; Fraser, P.E.; *Eur. J. Biochemistry* **2000**, *267*, 6692.
121. White, A.R.; Multhaup, G.; Maher, F.; Bellingham, S.; Camakaris, J.; Zheng, H.; Bush, A.I.; Beyreuther, K.; Masters, C.L.; Cappai, R.; *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 9170.
122. Walkup, G.K; Imperiali, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3443.
123. Bush, A.I.; Muithaupl, G.; Moir, R.D.; Williamson, T.G.; Small, D.H.; Rumble, B.; Pollweinn, P.; Beyreutherll, K.; Masters, C.L.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16109.
124. Green, L. M.; Berg, J.M.; *Biochemistry* **1989**, *86*, 4047.

125. Michael, S.F.; Kilfoil, V.J.; Schmidt, M.H.; Amann, B.T.; Berg, J. M.; *Biochemistry* **1992**, *89*, 4796.
126. Robinson, N.J.; Tommey, A.M.; Kusket, C.; Jackson, P.J.; *Biochem. J.* **1993**, *295*, 1
127. Jackson, G.S.; Murray, I.; Husszu, L.L.P.; Gibbs, n.; Waltho, J.P.; Clarke, A.R.; Collinge, J.; *Biochemistry* **2001**, *98*, 8531.
128. Lane, T.F.; Iruela-Arispe, M.L.; John, R.S.; Sage, E.H.; *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 929.
129. Garnett, A.P.; Viles, J.H.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6795.
130. Lehmann, S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 187.
131. Stöckel, J.; Safar, J.; Wallace, A.C.; Cohen, F.E.; Prusiner, S.B.; *Biochemistry* **1998**, *37*, 7185
132. Mendieta, J.; Díaz-Cruz, M.S.; Monjonell, A.; Tauler, R.; Esteban, M.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *390*, 15.
133. Kotrba, P.; Doleckova, L.; Lorenzo, V.; Ruml, T.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1092
134. Vögeli-Lange, R.; Wagner, G.J.; *Plant Physiol.* **1990**, *92*, 1086.
135. Payne, J.C.; Horst, M.A.; Godwin, H.A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6850.
136. Zhang, Y.; Akilesh, S.; Wilcox, D.E.; *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3057.
137. Opazo, C.; Barría, M.I.; Ruiz, F.H.; Inestrosa, N.C.; *BioMetals* **2003**, *16*, 91.
138. Mlynarz, P.; Valesin, D.; Kociolek, K.; Zabrocki, J.; Olejnik, J.; Kozlowski, H.; *New J. Chem.* **2002**, *26*, 264.
139. Matzapetakis, M.; Ghosh, D.; Weng, T.; Penner-Hahn, J.E.; Pecoraro, V.L.; *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 876.
140. Grosseohme, N.E.; Akilesh, S.; Guerinot, M.L.; Wilcox, D.E.; *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8500.
141. Huang, J.C.Z.; Merrifield, M.E.; Salgado, M.T.; Stillman, M.J.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233 - 234*, 319.
142. Magyar, J.S.; Godwin, H.A.; *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 39.
143. Lide, D. R. *Handbook of Chemistry and physics*, CRC Press: New York, 2000.
144. Saroff, H.A.; Mark, H.J.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1240.

IX – ANEXOS

1. ESTRUTURA QUÍMICA DOS AMINOÁCIDOS

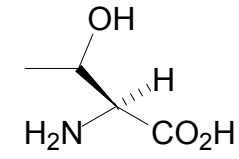
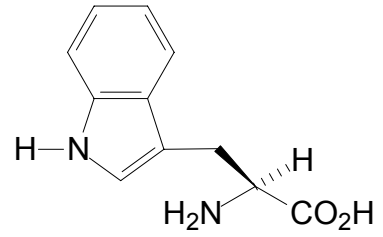
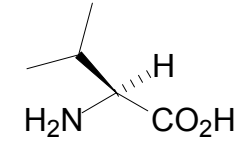
Tabela 30. Estrutura química dos aminoácidos

Aminoácido	Símbolo	Estrutura
Ácido Aspártico	Asp, D	
Ácido Glutâmico	Glu, E	
Alanina	Ala, A	
Arginina	Arg, R	
Asparagina	Asn, N	
Cisteína	Cys, C	
Fenilalanina	Phe, F	
Glicina	Gly, G	

Tabela 30. Estrutura química dos aminoácidos (continuação)

Aminoácido	Símbolo	Estrutura
Glutamina	Gln, Q	
Histidina	His, H	
Isoleucina	Ile, I	
Leucina	Leu, L	
Lisina	Lys, K	
Metionina	Met, M	
Prolina	Pro, P	
Serina	Ser, S	
Tirosina	Tyr, Y	

Tabela 30. Estrutura química dos aminoácidos (continuação)

Aminoácido	Símbolo	Estrutura
Treonina	Thr, T	
Triptofano	Trp, W	
Valina	Val, V	

2. LOCALIZAÇÃO DOS POSSÍVEIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS NA ESTRUTURA DA CATALASE

Tabela 31. Localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase

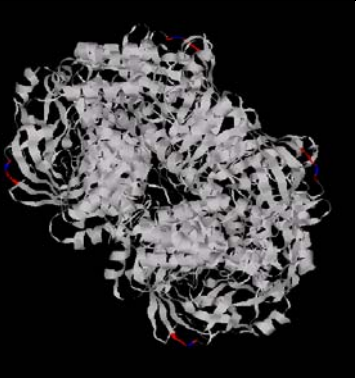
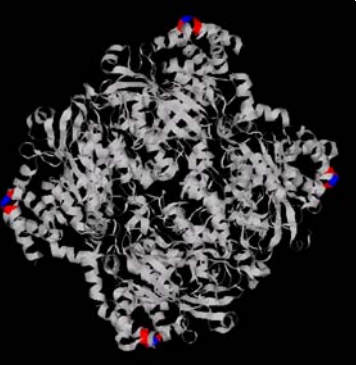
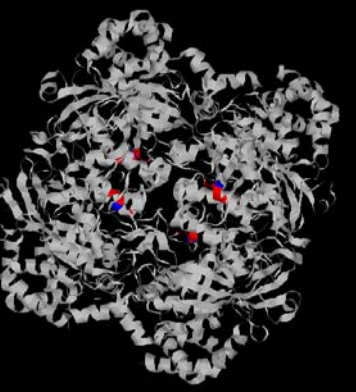
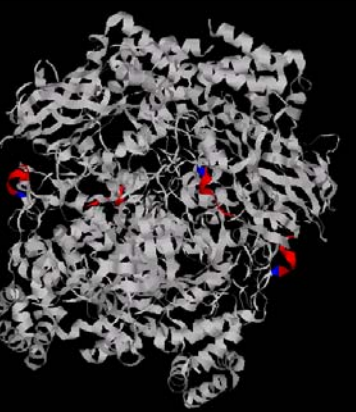
SEQUÊNCIA	
VT ^A HD	
VH ^A PE	
MA ^A HFD	
HQ ^A PSALE	

Tabela 31. Localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase (continuação)

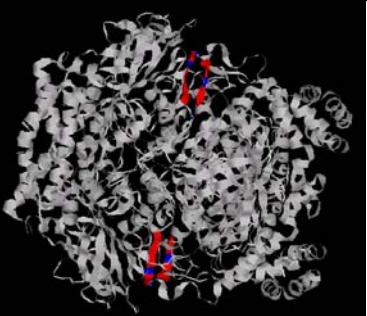

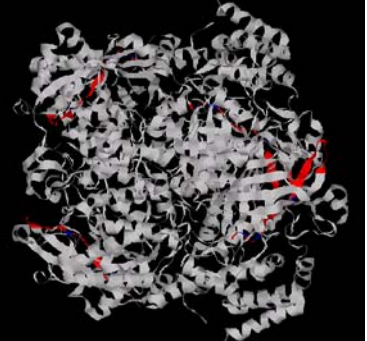
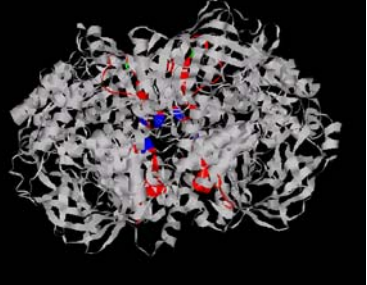
SEQUÊNCIA	
<p>HRTHFSGD</p>	
<p>SLHQVSFLFSD</p>	
<p>GHRHMNGYGS HTFKLVNANGE</p>	
<p>THRHLGPNYLQIPV NCPYRARVANYQRD</p>	

Tabela 31. Localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase (continuação)

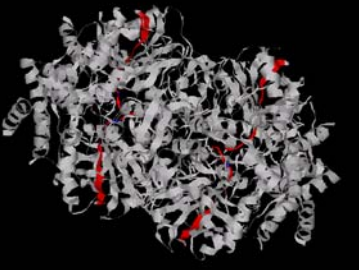

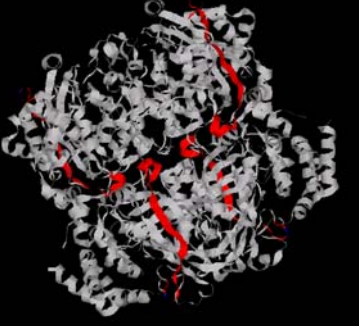
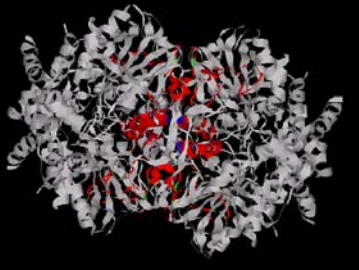
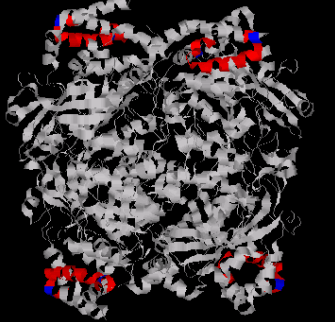
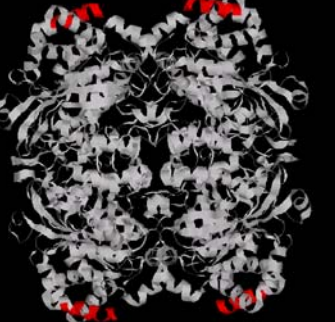
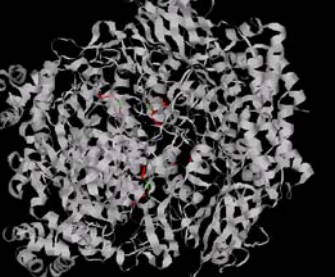
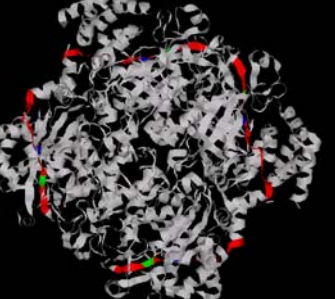
SEQUÊNCIA	
<p>RVVHAKG AGAFGYFE</p>	
<p>HIGKRTPIA VRFSTVAGE</p>	
<p>DPDYGLRDLFNAIATGNYPSTL YIQVMTFSE VWPBHDYPLIPVGK LVLNRNPVNYFAE</p>	
<p>PSPDKMLQGRLFAYPDTHRHLG PNYLQIPVNCOPYRARVANYQRDG PMCMMDNQGGAPNYYPNSFSAPE</p>	

Tabela 31. Localização dos possíveis sítios de ligação de íons metálicos na estrutura da catalase (continuação)

SEQUÊNCIA	
<p>NIAGHLKDAQLFIQ KKAVKNFSDVHPE</p>	
<p>EKPKNNAVHTYVQHGSHLSARE</p>	
<p>GPMCMMMD</p>	
<p>AVYCKFHYKTDQGKILNSVE</p>	

3. TRABALHOS PUBLICADOS

3.2 14^o Encontro Nacional de Química Analítica



ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA CATALASE E OS ÍONS Zn^{2+} POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA

Jonatas G. da Silva^{1,2} (PG)*, Jurandir R. de Souza² (PQ) e Clarissa S. Pires de Castro¹ (PQ)

jonatasgomes@unb.br

¹ LSA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-900, Brasília – DF

² LQAA, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília-DF

Palavras Chave: catalase, voltametria de redissolução anódica, zinco

Introdução

A catalase (CAT) é uma enzima responsável pela redução de H_2O_2 a H_2O e O_2 ^{1,2}, que apresenta alguns sítios de ligação para o zinco (Cys, His). O zinco possui um papel antioxidante importante, pois evita a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO), principais responsáveis pelo estresse oxidativo. Este trabalho tem como objetivo estudar a interação dos íons Zn^{2+} com a CAT, em meio semelhante ao fisiológico, por voltametria de redissolução anódica, para determinar os parâmetros quantitativos do sistema (estequiometria, constante de dissociação (K_d) e potencial padrão de redução ($E^{0'}$)).

Experimental

A concentração da solução de CAT de fígado bovino foi determinada por espectroscopia UV-Vis, a 280 nm, por meio da lei de Beer. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797, uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}) (referência) e platina (auxiliar) e o tampão borato pH 7,00 como eletrólito suporte. A identificação teórica dos sítios de ligação de Zn na CAT foi realizada por comparação das características físico-químicas, determinadas com o software scale index, de peptídeos padrão que se ligam a Zn^{2+} e dos peptídeos gerados na clivagem da CAT com a GluC2 e V8 proteinase, utilizando-se o software Peptide Cutter.

Resultados e Discussão

A figura 1 mostra os voltamogramas de redissolução anódica obtidos para 100 μL de Zn^{2+} 1×10^{-4} mol L^{-1} , em 10 mL de tampão borato pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . Observou-se o decaimento completo da corrente de oxidação do zinco após a adição de 94,65 μL da solução de CAT e o aparecimento de um sinal em torno de -0,95 V, que pode ser atribuído ao complexo

14^o Encontro Nacional de Química Analítica

Zn^{2+} -CAT, pois o valor calculado para o $E^{0'}$, por meio do valor de K_d e da equação de Nernst, foi semelhante. Estes resultados evidenciam a interação do zinco com a catalase e apontam para uma estequiometria de 20 Zn^{2+} : 1 CAT, cujo valor é coincidente com os determinados nos estudos teóricos se considerarmos apenas os sítios de zinco, os quais envolvem histidinas e cisteínas, favoráveis à ligação. O K_d para o complexo foi calculado utilizando-se o método da titulação amperométrica³ ($K_d = 1,62 \times 10^{-11}$ mol L^{-1}).

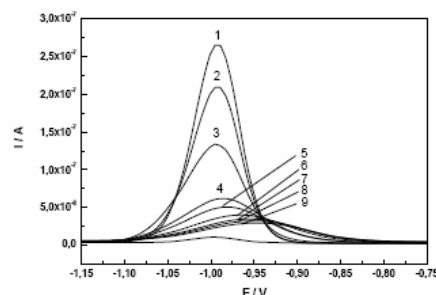


Figura 1. Voltamogramas de redissolução anódica obtidos para 100 μL de Zn^{2+} 1×10^{-4} mol L^{-1} em 10 mL de tampão borato pH 7,0 na ausência (1) e na presença de CAT (2 a 9). Adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} .

Conclusões

A estequiometria, o K_d e o $E^{0'}$ determinados para o sistema Zn^{2+} -CAT são inéditos, pois estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. O valor de K_d indica a formação de complexo bastante estável entre o Zn^{2+} e a CAT e corrobora a hipótese da atuação do zinco no combate a formação das ERO.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPq e CAPES.

[1] Ferreira, A.L.A. et al. *Rev. Ass. Med. Brasil* 43, (1997) 61.

[2] Rahman, I. et al. *Eur. J. of Pharmacol.* 533, (2006) 222.

[3] Saroff, H.A.; Mark, H.J.; *J. Amer. Chem. Soc.* 75, (1953) 1240.



ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA CATALASE E OS ÍONS Cu^{2+} POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA

Jonatas G. da Silva^{1,2} (PG)*, Jurandir R. de Souza² (PQ) e Clarissa S. Pires de Castro¹ (PQ)

jonatasgomes@unb.br

¹LSA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-900, Brasília – DF

²LQAA, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília-DF

Palavras Chave: catalase, voltametria de redissolução anódica, cobre

Introdução

A catalase (CAT) apresenta alguns sítios de ligação para cobre, que ao se ligar poderá causar mudanças conformacionais ou estabilizar a estrutura da enzima, resultando na sua inibição ou ativação. A inibição da CAT, que ocorre com excesso de cobre, aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao estresse oxidativo. Este trabalho tem como objetivo estudar a interação dos íons Cu^{2+} com a CAT utilizando a voltametria de redissolução anódica, para determinar a estequiometria, a constante de dissociação (K_d) e o potencial padrão de redução ($E^{0'}$) do complexo.

Experimental

A padronização da solução de CAT de fígado bovino foi realizada por espectroscopia Uv-Vis, a 280 nm, utilizando-se a lei de Beer. Para a realização das medidas voltamétricas, utilizou-se o analisador voltamétrico Metrohm 797, uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE (trabalho), Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) (referência) e platina (auxiliar) e o tampão McIlvaine pH 7,00 como eletrólito suporte. Os sítios teóricos de ligação de Cu foram identificados na CAT por meio da comparação das características físico-químicas, determinadas com o software scale index, de peptídeos padrão que se ligam a Cu e dos peptídeos gerados na clivagem da CAT com a GluC2 e V8 proteinase, utilizando-se o software Peptide Cutter.

Resultados e Discussão

Os voltamogramas obtidos para 100 μL de $\text{Cu}^{2+} 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ são mostrados na figura 1. Observa-se que a adição de 117,54 μL da solução de CAT à solução provoca a diminuição da corrente de oxidação do cobre, mostrando a interação do íon Cu^{2+} com a catalase. Com base neste dado a estequiometria

14^º Encontro Nacional de Química Analítica

encontrada para o complexo foi de 16 Cu^{2+} : 1 CAT, valor que coincide com o obtido nos estudos teóricos se considerarmos apenas os sítios de Cu, os quais envolvem histidinas e cisteínas, favoráveis à ligação. Utilizou-se o método da titulação amperométrica³ para a determinação do K_d do complexo Cu^{2+} -CAT ($K_d = 1,73 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$). O $E^{0'}$ (+0,27 V), calculado por meio do valor de K_d e da equação de Nernst., justifica a ausência do sinal característico do complexo Cu^{2+} -CAT nos voltamogramas obtidos.

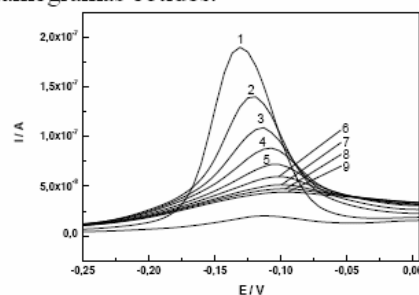


Figura 1. Voltamogramas de redissolução anódica obtidos para 100 μL de $\text{Cu}^{2+} 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,00 na ausência (curva 1) e na presença de CAT (2 a 9). Adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Conclusões

A estequiometria, o K_d e o $E^{0'}$ determinados para o sistema Cu^{2+} -CAT são inéditos, pois estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. O valor de K_d indica a formação de complexo bastante estável entre o Cu^{2+} e a CAT e sugere a participação do cobre no mecanismo de geração ou proteção contra ERO, dependendo da sua concentração nas células.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPq e CAPES.

[1] Masarwa, M. et al.; *J. Am. Chem. Soc.* 110, (1988), 4293.

[2] Bal, W.; Kasprzak, K.S.; *Toxicology Letters* 127 (2002), 55.

[3] Saroff, H.A.; Mark, H.J.; *J. Amer. Chem. Soc.* 75, (1953) 1240.