

INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA CATALASE E OS ÍONS Cu(II): SÍTIOS DE LIGAÇÃO, ESTEQUIOMETRIA, K_d E E^0 POR CV, DPV E FERRAMENTAS TEÓRICAS

Jonatas G. da Silva^{1,2} (PG)*, Luciano P. da Silva² (PQ), Jurandir R. de Souza³ (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 LEM, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-900, Brasília – DF

³ LQAA, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

Palavras Chave: Catalase, voltametria cíclica e cobre

Introdução

O excesso de cobre, componente essencial de várias enzimas antioxidantes, pode provocar mudanças conformacionais ou estabilizar a estrutura da enzima catalase (CAT), resultando na sua inibição ou ativação. A inibição da CAT aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao estresse oxidativo. Este trabalho tem como objetivo estudar a interação dos íons Cu(II) com a CAT utilizando a voltametria cíclica (CV), a voltametria de pulso diferencial (DPV) e ferramentas teóricas, para determinar os sítios de ligação, a estequiometria, o K_d e o E^0 do complexo.

Experimental

Os possíveis sítios de ligação do Cu(II) na CAT foram identificados, considerando apenas os sítios sem impedimento estérico contendo resíduos de His e Cys, por meio de comparação dos parâmetros físico-químicos (MM, pl e MH), determinadas com o software scale index, de peptídeos padrão que se ligam a cobre dos peptídeos gerados na clivagem da CAT com as enzimas GluC2 e V8-proteinase, utilizando-se os softwares Cutter e Peptide Cutter, respectivamente. A padronização da solução de CAT de fígado bovino (Sigma) 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 /DME (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar) e o tampão Mcllvaine pH 7,00 como eletrólito suporte.

Resultados e Discussão

Os voltamogramas cíclicos obtidos para 100 μ L de Cu(II) 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT 5,35 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ são mostrados na Figura 1a. Observa-se que a adição de 116,92 μ L da solução de CAT à solução provoca a diminuição da corrente de oxidação do cobre, mostrando a interação do íon Cu(II) com a catalase. Esta interação também foi

confirmada pelo decaimento do pico de redução do cobre até um valor próximo de zero nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para 50 μ L de Cu(II) 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT 5,35 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (Figura 1 b). Com base nestes dados a estequiometria encontrada para o complexo, em ambas as técnicas, foi de 16 Cu(II): 1 CAT, valor este que está de acordo com o número de possíveis sítios identificados para o cobre no estudo teórico (24 sítios). Utilizou-se o método da titulação amperométrica² para a determinação do K_d do complexo Cu(II)-CAT ($K_d = 1,25 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ - CV e 1,81 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ - DPV). O E^0 (+0,27 V), calculado por meio dos valores de K_d e da equação de Nernst, justifica a ausência do sinal característico do complexo Cu(II)-CAT nos voltamogramas obtidos.

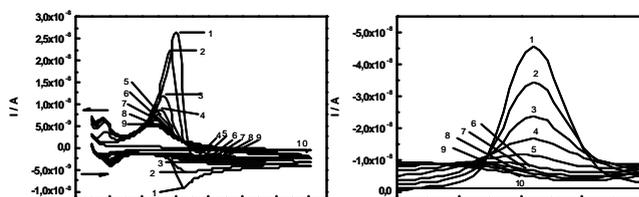


Figura 1. a) Voltamogramas cíclicos obtidos para 100 μ L de Cu(II) 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ b) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para 50 μ L de Cu(II) 1 x 10⁻³ mol L⁻¹; em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,0 na ausência (1) e na presença de CAT 5,35 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (2 a 9).

Conclusões

A estequiometria, o K_d e o E^0 determinados para o sistema Cu(II)-CAT são inéditos, pois estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. O excesso de Cu(II) no meio celular pode provocar a inibição da CAT pela formação de um complexo bastante estável, contribuindo desta maneira para o estresse oxidativo.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPq e CAPES.

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

² Saroff, H.A.; Mark, H.J.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1240.