

**Brasília, DF  
Dezembro, 2008**

**Autor**

J. G. da Silva  
Químico, Mestrando,  
Universidade de Brasília  
jonatasgomes@unb.br

L. P. da Silva  
Biólogo PhD, Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia  
paulinol@cenargen.embrapa.br

Jurandir Rodrigues de Souza,  
PhD, Químico, Universidade de  
Brasília, e-mail:  
rodsouza@unb.br

C. S. P. de Castro  
PhD, Química, Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia, e-mail:  
clarissa@cenargen.embrapa.br



## O ESTUDO DOS COMPLEXOS Zn(II)-CAT e Cu(II)-CAT UTILIZANDO A VOLTAMETRIA CÍCLICA E A DE PULSO DIFERENCIAL

### Introdução

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante, encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, no rim e no fígado (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; RAHMAN et al., 2006), com a função de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). 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. Cada cadeia polipeptídica, com cerca de 60 KDa de massa molecular, possui um grupo heme com o íon  $Fe^{3+}$  atuando como centro redox. O excesso de cobre e zinco no meio celular pode provocar a inibição da CAT por meio da formação de complexos estáveis, pois esta enzima apresenta sítios de ligação para o zinco e cobre (Cys, His). A inibição da CAT aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao estresse oxidativo.

Alguns estudos 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 (CASALINO et al., 2002; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2002; DRAZKIEWICZ et al., 2004; HONDA et al., 2004; MARCHLEWICZ et al., 2004; FATIMA e AHMAD, 2005; ATLI et al., 2006).

Silva e colaboradores (SILVA et al., 2007) identificaram por meio de estudo teórico os possíveis sítios de ligação dos íons Zn(II) (28 possíveis sítios de ligação) e Cu(II) (24 possíveis sítios de ligação) na estrutura da CAT (Figura 1), levando em consideração os resíduos com maior afinidade pelos metais (histidina e cisteína) e de possível impedimento estérico. No mesmo trabalho, estudaram separadamente a interação dos íons Zn(II) e Cu(II) com a CAT, em meio semelhante ao fisiológico, por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

(DPASV). Por meio do decaimento das correntes de oxidação do zinco e do cobre na presença de CAT, foram evidenciados a formação dos complexos entre a CAT e os íons Zn(II) (20 Zn(II):1;  $K_d = 1,62 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $E^0 = -0,85\text{V}$ ) e Cu(II) (16 Cu(II):1 CAT;  $K_d = 1,73 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $E^0 = +0,27\text{V}$ ). Os valores da constante de dissociação ( $K_d$ ) indicam a formação de complexos bastantes estáveis entre o Zn(II) e o Cu(II) com a CAT, sugerindo a participação do zinco e do cobre na redução da atividade da enzima catalase.

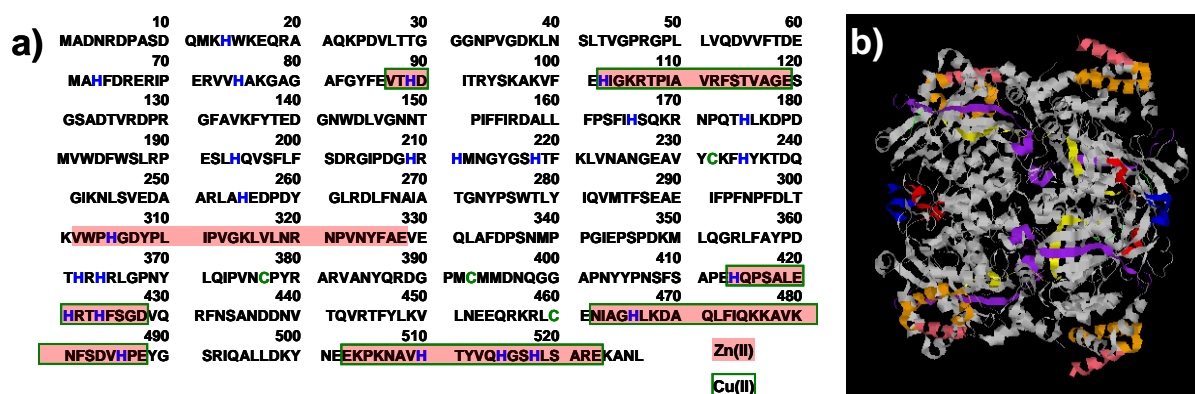


Figura 1. a) Seqüência de peptídeos de um monômero da catalase bovina e os possíveis sítios de ligação dos íons Zn(II) e Cu(II); b) Localização dos possíveis sítios de ligação dos íons Zn(II) e Cu(II) na estrutura da catalase.

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  $E^0$ ) (CASTRO et al., 2000, 2001, 2002, 2003a, 2003b). O objetivo deste trabalho é estudar a interação dos íons Zn(II) e Cu(II) com a CAT,

em meio semelhante ao fisiológico, por voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DP) para determinar os parâmetros quantitativos do sistema (estequiometria, constante de dissociação), pois estes são essenciais para uma melhor compreensão do papel dos metais no estresse oxidativo.

## Material e Métodos

A pureza da CAT de fígado bovino (sigma) foi verificada por espectrometria de massa MALDI-TOF utilizando o espectrômetro de

massa UltraFlex II (Brucker) e o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. A solução de catalase foi inicialmente misturada em uma solução saturada da matriz na razão 1:3 (2  $\mu\text{L}$  da amostra para 6  $\mu\text{L}$  da matriz). Em seguida, a mistura foi depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm (0,5  $\mu\text{L}$  por spot) e deixada secar a temperatura ambiente. Após a secagem da placa foi realizada a análise no espectrômetro de massa.

A concentração da solução de CAT foi determinada por espectroscopia Uv-Vis, a 280 nm, por meio da lei de Beer. A absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foi calculada pelo método de Edelhoch (EDELHOCH, 1967). 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  $\text{L}^{-1}$ ) (referência) e platina (auxiliar) e os tampões borato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e McIlvaine pH 7,00 como eletrólitos suporte.

Foram realizados ensaios 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  $\text{M}^{2+}$  – 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) ótimos para o estudo voltamétrico da interação dos íons metálicos com a catalase.

A titulação amperométrica do zinco e do cobre com a catalase foi realizada com adições sucessivas de 20  $\mu\text{L}$  ou 10  $\mu\text{L}$  de catalase  $5,35 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  na célula eletroquímica contendo 100  $\mu\text{L}$  ou 50  $\mu\text{L}$  de Zn(II) ou Cu(II)  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  em 10 mL do eletrólito suporte. As medidas voltamétricas foram realizadas em temperatura ambiente e foi borbulhado nitrogênio na célula eletroquímica, para remoção do oxigênio (10 min para o eletrólito suporte e 1 min após cada adição de catalase).

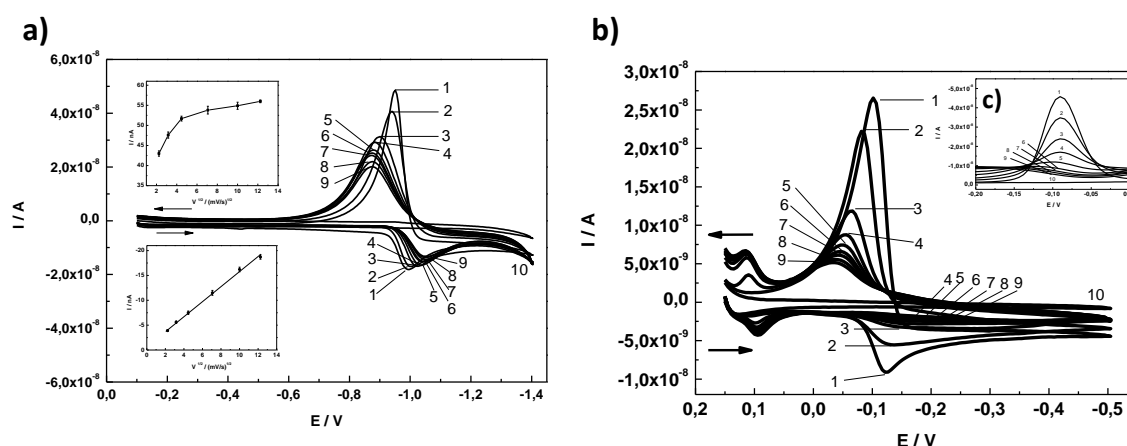
## Resultados e Discussão

A pureza da catalase comercial foi verificada por espectrometria de massa MALDI-TOF, e observou-se a presença de constituintes de baixa massa molecular (menores que 14000 Da), porém em baixas concentrações em relação à catalase, não sendo considerados possíveis interferentes nos estudos voltamétricos. A catalase foi caracterizada por meio do aparecimento de picos no espectro de massa correspondentes as cargas (dupla, tripla, até a octa carga) do seu monômero ( $\text{MM} = 57608$  Da).

Os voltamogramas cíclicos obtidos para 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Zn}^{2+}$   $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , em 10 mL de tampão borato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,00, na ausência e na presença de CAT  $5,35 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  são mostrados na Figura 2a. O decaimento completo das correntes de oxidação e de redução, após a adição de 95  $\mu\text{L}$  da solução de CAT, evidencia a interação entre o Zn(II) e a CAT. Utilizando curvas do tipo I vs  $v^{1/2}$  (Figura 2a), verificou-se 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. Com base nos voltamogramas cíclicos obtidos, concluiu-se que o processo redox na presença de CAT é quasi-reversível. Para 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu(II)}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em 10 mL de tampão Mcllvaine pH 7,00 (Figura 2b), observou-se que a adição de 116,92  $\mu\text{L}$  de CAT  $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  provoca a diminuição da corrente de oxidação do cobre, evidenciando a interação do íon  $\text{Cu(II)}$  com a CAT. 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  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu(II)}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em 10 mL de tampão

Mcllvaine pH 7,00, na ausência e na presença de CAT  $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 2 b). O processo de redução do cobre na superfície do eletrodo de mercúrio, na ausência de CAT em tampão Mcllvaine pH 7,00, é difusional e o processo de oxidação do cobre é 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. Com base nos dados obtidos pelas titulações amperométricas, a estequiometria encontrada para os complexos foi 20  $\text{Zn(II)}:1 \text{ CAT}$  e 16  $\text{Cu(II)}:1 \text{ CAT}$ , valores que coincidem com os obtidos por meio da técnica de DPASV e nos estudos teóricos (SILVA et al., 2007).



**Figura 2.** a) Voltamogramas cíclicos para a) 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Zn(II)}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em 10 mL de tampão borato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  pH = 7,00. b) 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu(II)}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00. Na ausência (1) e na presença de CAT (2 a 9). Adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160  $\mu\text{L}$  de CAT  $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . c) Voltamogramas de pulso diferencial para 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu(II)}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em 10 mL de tampão Mcllvaine pH = 7,00. Na ausência (1) e na presença de CAT (2 a 9). Adições sucessivas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80  $\mu\text{L}$  de CAT  $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidades de varredura = 5, 10, 20, 50, 60, 100, 150  $\text{mV s}^{-1}$ , Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3  $\text{mol L}^{-1}$ ).

Utilizando o método da titulação amperométrica (SAROFF e MARK, 1953), determinou-se os valores de  $K_d$ , para os sistemas Zn(II)-CAT ( $2,98 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ ) e Cu(II)-CAT ( $1,25 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  – CV e  $1,81 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  - DPV), os quais mostram a estabilidade dos complexos e sugerem o envolvimento desses metais no estresse oxidativo.

### Conclusão

A CAT forma complexos com os íons Zn(II) e Cu(II), os quais foram evidenciados pelo decaimento das correntes de oxidação e redução do zinco e do cobre na presença de CAT. A estequiometria (20 Zn(II):1 CAT e 16 Cu(II):1 CAT) e o  $K_d$  ( $2,98 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$  - Zn(II) - CAT e  $1,25 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  – CV e  $1,81 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  - DPV - Cu(II) - CAT) determinados para os sistemas Zn(II)-CAT e Cu(II)-CAT são semelhantes aos encontrados utilizando ferramentas teóricas e a técnica de DPASV. Os valores de  $K_d$  indicam a formação de complexos bastantes estáveis entre o Zn(II) e o Cu(II) com a CAT, sugerindo a participação do zinco e do cobre na redução da atividade da enzima catalase, dependendo da concentração no meio celular, por meio da formação de um complexo estável, contribuindo desta maneira para o estresse oxidativo.

### Referências Bibliográficas

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in five tissues of

freshwater fish *Oreochromis niloticus*.

**Comparative biochemistry and physiology. Part C. Toxicology and pharmacology**, New York, v. 143, p. 218-224, 2006.

CASALINO, E.; CALZARETTI, G.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. **Toxicology**, Limerick, Irlanda, v. 179, p. 37-50, 2002.

CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C.; BRAZ, J. Zinc binding to lambda phage DNA studied by voltammetric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 398-404, 2000.

CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. Studying proteins by voltammetric techniques. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 88-129, 2001.

CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. Ca(II)- $\gamma$ -Thionin complex: interaction studies by differential pulse voltammetry and MALDI-TOF/MS. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, NL, v. 9, n. 1, p. 45-52, 2002.

CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. The Binding of Zinc (II) to Mung Bean Nuclease. A voltammetric study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 94, n. 4, p. 365-371, 2003a.

CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. Investigations on the binding of mercury ions to albumins employing differential pulse voltammetry. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, NL, v. 10, n. 2, p. 155-164, 2003b.

DRAZKIEWICZ, M.; SKORZYNSKA-POLIT, E. S.; KRUPA, Z. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. **BioMetals**, London, v. 17, p. 379-387, 2004.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of Tryptophan and Tyrosine in proteins. **Biochemistry**, New York, v. 6 n. 7, p. 1948-1954, 1967.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as

biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 346, p. 256-273, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

HONDA, K.; CASADESUS, G.; PETERSEN, R. B.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1012, p. 179-182, 2004.

MARCHLEWICZ, M.; MICHALSKA, T.; WISZNIEWSKA, B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, v. 57, p. 1553-1562, 2004.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 533, n. 1-3, p. 222-229, 2006.

SAROFF, H. A.; MARK, H. J. Polarographic analysis of the serum albumin-mercury and zinc complexes. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, US, v. 75, n. 5, p. 1420-1426, 1953.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; NIKOLOVA, P.; RUDOLF, C.; POLLE, A. Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in *Populus × canescens* roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 577-584, 2002.

SILVA, J. G.; SILVA, L. P.; SOUZA, J. R.; CASTRO, C. S. P. **Interação entre os íons Zn(II) e Cu(II) e a catalase, um estudo voltamétrico**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 7 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 55).

#### Circular Técnica, 83

Ministério da  
Agricultura,  
Pecuária  
e  
Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5  
Norte (Final) – Brasília, DF CEP  
70770-900 – Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61)  
3340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e-mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2008):

#### Comitê de Publicações

**Presidente:** Miguel Borges  
**Secretária-Executiva:** Maria da Graça Simões Pires Negrão  
**Membros:** Dina Maria de Alencar Dusi  
Luiz Adriano Maia Cordeiro  
José Roberto de Alencar Moreira  
Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
Samuel Rezende Paiva  
**Suplentes:** João Batista Tavares da Silva  
Margot Alves Nunes Dode  
**Supervisor editorial:** Maria da Graça Simões Pires Negrão  
**Normalização Bibliográfica:** Rosameres Rocha Galvão  
**Editoração eletrônica:** Maria da Graça Simões Pires Negrão

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

