

Brasília, DF
Dezembro 2007

Autores

Jonatas Gomes da Silva
Mestrando, Química,
Universidade de Brasília Brasília-
DF, Brasil,
jonatasgomes@unb.br

Luciano Paulino da Silva
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil,
paulinol@cenargen.embrapa.br

Jurandir Rodrigues de
Souza Universidade de
Brasília,-DF, Brasil,
rodsouza@unb.br

Clarissa Silva Pires de Castro
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.
clarissa@cenargen.embrapa.br

I

A INTERAÇÃO ENTRE OS ÍONS Zn(II) E Cu(II) E A CATALASE. UM ESTUDO VOLTAMÉTRICO

1. 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 (ERO), 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.

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 (H₂O₂) a água (H₂O) e oxigênio (O₂). 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 1). Cada cadeia polipeptídica, com cerca de 60 KDa de massa molecular, possui um grupo heme com o íon Fe³⁺ atuando como centro redox.

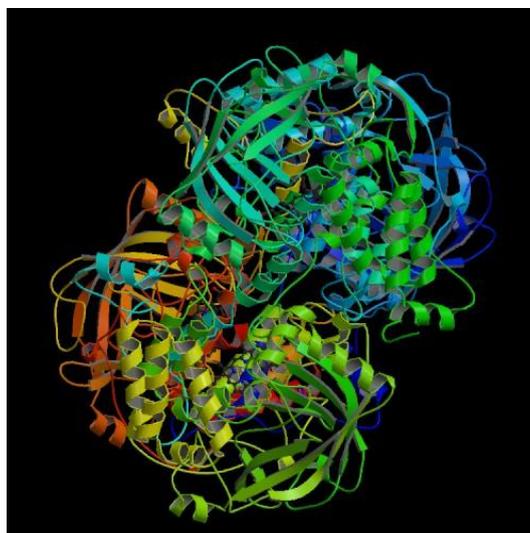


Figura 1. Estrutura tridimensional da enzima CAT hémica.
[Retirado de <http://www.rcsb.org/pdb>]

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, 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.

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).

Os estudos realizados até o momento não são conclusivos, 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.

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 identificar por meio de estudo teórico os possíveis sítios de ligação dos íons Zn(II) e Cu(II) na estrutura da CAT e estudar 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, para determinar os parâmetros quantitativos do sistema (estequiometria, constante de dissociação (K_d) e potencial padrão de redução do complexo (E^0)).

2. 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 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.

A concentração da solução de CAT foi determinada por espectroscopia Uv-Vis, a 280 nm, por meio da lei de Beer. A absorvidade molar (ϵ) 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 L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar) e os tampões borato 0,1 mol 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 M²⁺ – 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 μL de catalase $5,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na célula eletroquímica contendo 100 μL de Zn(II) ou Cu(II) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 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).

3. 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

A identificação teórica dos sítios de ligação de Zn(II) e Cu(II) na CAT foi realizada por comparação das características físico-químicas (massa molecular, ponto isoelétrico e momento hidrofóbico), determinadas com o software scale index, de peptídeos padrão que se ligam a Zn(II) e Cu(II) e

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 (MM = 57608 Da). A identificação dos possíveis sítios de ligação dos íons Zn(II) e Cu(II) na estrutura da CAT foi feita por meio da análise de gráficos 3D (Figura 2). Os agrupamentos observados nos gráficos são formados por peptídeos padrões (em amarelo na Figura 2) e por peptídeos obtidos pela clivagem da catalase com a GluC2 e V8-proteinase (em vermelho na Figura 2) com características físico-químicas semelhantes. Por meio destes agrupamentos foram identificados os possíveis candidatos a sítios de ligação dos íons Zn(II) e Cu(II) na estrutura da CAT. 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 (importantes para ligações com o zinco e o cobre) em sua estrutura. Em seguida, com os demais peptídeos e utilizando o software RasMol, verificou-se a localização dos possíveis sítios de ligação do zinco e do cobre na estrutura da catalase.

dos peptídeos gerados na clivagem da CAT com a GluC2 e V8-proteinase, utilizando-se os softwares Cutter e Peptide Cutter, respectivamente. A localização dos possíveis sítios de ligação do zinco e do cobre na estrutura da catalase foi feita utilizando o software RasMol.

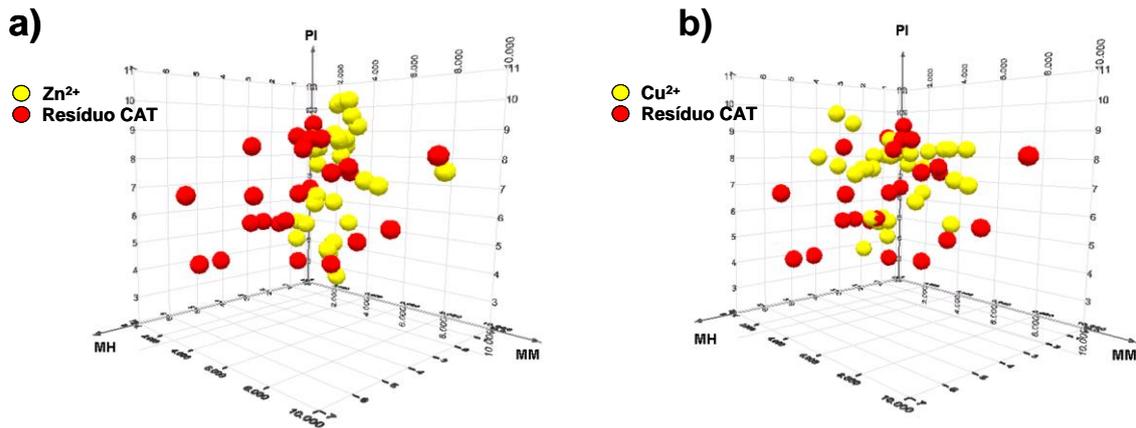


Figura 2. Gráficos tridimensionais dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos: a) Zinco e b) Cobre.

Apenas os sítios de ligação mostrados na Figura 3 estão localizados na parte externa da estrutura da enzima, aumentando desta forma a possibilidade de ligação de íons metálicos, não havendo a princípio impedimento estérico. O estudo teórico aqui utilizado foi apenas uma ferramenta

para indicar os possíveis sítios de ligação 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 neste estudo.



Figura 3. 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.

Nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para 100 µL de Zn(II) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00 (Figura 4a), na ausência e na presença de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, observou-se o decaimento completo da corrente de oxidação do zinco após a adição de 94,65 µL da solução de CAT, evidenciando a interação entre o Zn(II) e a CAT. Foi

verificado ainda o aparecimento de um sinal voltamétrico em torno de -0,95 V, que pode ser atribuído ao complexo Zn(II)-CAT, pois o valor calculado para o E^0 foi semelhante (-0,85 V). Para 100 µL de Cu(II) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,00 (Figura 4b), observou-se que a adição de 117,54 µL de CAT $5,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ provoca a eliminação completa da corrente de

oxidação do cobre, evidenciando a interação do íon Cu(II) com a CAT. Para este sistema, não foi observado o sinal voltamétrico característico do complexo, o que pode ser justificado pelo valor calculado de $E^0(+0,27\text{ V})$. Com base nestes dados, a estequiometria encontrada para os complexos foi 20 Zn(II):1 CAT e 16 Cu(II):1 CAT, cujo valores estão bem próximos do número de possíveis sítios identificados para o zinco e para o cobre na catalase por meio do estudo teórico (sete possíveis sítios de ligação do íon Zn^{2+} por monômero na estrutura da catalase; total = 28; 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 3), 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.

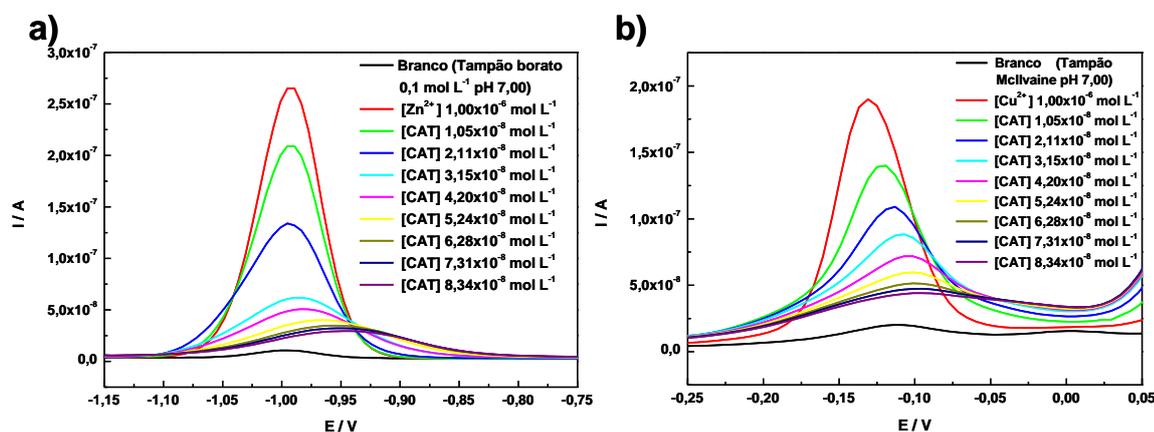


Figura 4. a) Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para a) 100 μL de Zn(II) $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão borato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,00. b) 100 μL de Cu(II) $1 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão McIlvaine pH = 7,00. Adições de 20 μL de CAT $5,35 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$, $E_d = -1,15\text{ V}$, $t_d = 60\text{ s}$, $E_i = -1,15\text{ V}$, $E_f = -0,75\text{ V}$, $v = 60\text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 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 ($1,62 \times 10^{-11}\text{ mol L}^{-1}$) e Cu(II)-CAT ($1,73 \times 10^{-10}\text{ mol L}^{-1}$), os quais mostram a estabilidade dos complexos e sugerem o envolvimento desses metais no estresse oxidativo.

4. CONCLUSÃO

Por meio do estudo teórico, foi possível identificar na estrutura da catalase os possíveis sítios de ligação

dos íons metálicos Zn(II) (28 possíveis sítios de ligação) e Cu(II) (24 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.

A CAT forma complexos com os íons Zn(II) e Cu(II), os quais foram evidenciados pelo decaimento das correntes de oxidação do zinco e do cobre na presença de CAT. A estequiometria (20 Zn(II):1 CAT e 16 Cu(II):1 CAT) o K_d ($1,62 \times 10^{-11} \text{ molL}^{-1}$ - Zn(II) - CAT e $1,73 \times 10^{-10} \text{ molL}^{-1}$ - Cu(II) - CAT) e o E^0 (-0,85V - Zn(II) - CAT e + 0,27V - Cu(II) - CAT) determinados para os sistemas Zn(II)-CAT e Cu(II)-CAT são inéditos, pois estes parâmetros ainda não estão disponíveis na literatura. 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

- ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology, Part C**, 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, IE, 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)- γ -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. **Chemospher**, 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 H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 577-584, 2002.

**Circular
Técnica, 55**

**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 (2007):

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoreção eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*