

ESTUDO COMPARATIVO DA REATIVIDADE DE Fe(III)MP E Mn(III)MP EM INTERFACES CATIÔNICAS

Marcela de Siqueira Cardoso Silva¹; Tatiana Prieto² e Iseli L. Nantes³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: marcelasicas@yahoo.com.br¹

Colaboradora Doutoranda da UMC; e-mail: tati_prieto@yahoo.com.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; email: ilnantes@umc.br³

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica

Palavras-chaves: Microperoxidases; CTAB; Catálise; Peróxidos.

INTRODUÇÃO

Microperoxidases são hemopeptídeos obtidos pela digestão peptídica e trípica do citocromo *c* de coração de cavalo. Como o citocromo *c*, este peptídeo exibe o grupo heme covalentemente ligado a dois resíduos de cisteína através de pontes tioeter. Quando a hidrólise digestiva do citocromo *c* é feita com pepsina, o produto da digestão é um undecapeptídeo, ou seja, o grupo heme ligado a uma cadeia de 11 aminoácidos (MP-11), o qual digerido por tripsina resulta em MP-8. Quando a enzima tripsina é utilizada para digerir o citocromo *c*, a microperoxidase resultante, é constituída de 9 resíduos de aminoácidos (MP-9). Intermediários de alta valência das MPs têm sido detectados durante a reação com peróxidos de hidrogênio e t-butilhidroperóxido (t-BuOOH) demonstrando que estes hemopeptídeos são um bom modelo para Compostos 0, I e II de peroxidase de raiz forte.⁵ Foi demonstrado um efeito competitivo dos prótons na reação de Fe(III) ou Mn(III)MP-8 com peróxido de hidrogênio, sugerindo que o Composto 0 precede a formação de intermediários de alta valência de Fe(III)- ou Mn(III)-MP-8. Na comparação com HRP, MP-8 em meio aquoso não exibe um sítio contendo um resíduo distal básico capaz de promover a desprotonação do peróxido e favorecer a clivagem da ponte O-O do peróxido. Estas características podem de algum modo, ser responsáveis pela baixa reatividade da MP-8 em pH ácido. Estudos demonstraram que a associação de Fe(III)MP-8 com um ambiente micelar, como CTAB, promove um microambiente com uma interface alcalina e um núcleo hidrofóbico, que dá características especiais para o Fe(III)MP-8/peróxido (*t*-BuOOH e HOOH) quando comparada ao meio homogêneo. Este agregado micela/hemopeptídeo funciona como uma lipoenzima com especificidade para diferentes substratos.

OBJETIVO

Nesse estudo, nosso objetivo é determinar o efeito das micelas de CTAB e lipossomos de DODAB e de um doador de prótons, a histidina, sobre a reatividade de Mn(III)MP-11 e analisar os resultados de forma comparativa com nossos prévios estudos conduzidos com Fe(III)MP-11.

METODOLOGIA

Espectrometria - As mudanças espectrais verificadas na presença e ausência de histidina e pela formação de intermediários de alta valência foram determinados através do Espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1501 MultiSpec (Tóquio, Japão).

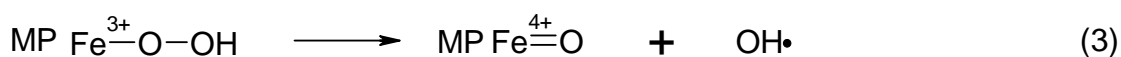
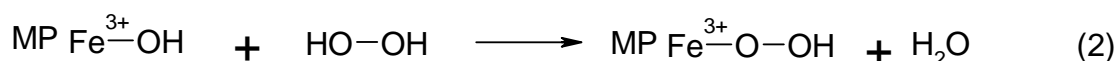
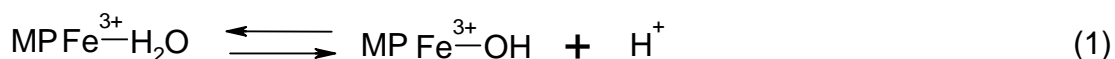
Preparação das micelas de CTAB - As micelas de CTAB foram preparadas pela diluição de CTAB em 5 mM tampão Carbonato ou Histidina à temperatura de 37° C.

Preparação dos lipossomos de DODAB - Os lipossomos de DODAB foram preparados pela diluição de DODAB em 5 mM tampão Carbonato ou Histidina à temperatura de 60°C, sob agitação por 10 minutos. Após, agitação no vortex por 5 minutos.

Síntese do Mn(III)MP - FeMP é convertida em base livre pelo tratamento com HF, seguida de purificação em coluna de gel filtração (G-10) em acetato de amônio 10 mM pH 5.5. A inserção do manganês é feita em solução de acetato de manganês 10 mM sob aquecimento a 40 °C, protegido da luz, por 37 horas e a incorporação confirmada pelas bandas Soret 368 nm e 463 nm, seguida de purificação em HPLC semipreparativa.³

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com dados da literatura publicados por Primus et al.³, Fe(III) e Mn(III) MPs, em tampão bicarbonato, são convertidas em Composto II (Fe(IV)=O e Mn(IV)=O) por peróxido de hidrogênio em uma reação inibida competitivamente pelo aumento da concentração de H⁺ no meio, porque a coordenação do peróxido com o metal porfirínico é favorecida pelo desprotonamento da água coordenada com o mesmo (Esquema 1, Eq. 1). No caso de Mn(III)MP, o abaixamento do pH do meio de 10,9 para 10,2 resulta em uma diminuição de 50% na eficiência catalítica da MP. Nessa condição, a conversão total das MPs a Composto II ocorre na escala de microsegundos. Em estudo posterior publicado por nosso grupo⁴ demonstramos que a associação de Fe(III)MP com micelas de CTAB favorece a reação em pH mais ácido devido ao fato de que as micelas catiônicas proporcionam uma interface alcalina para a ocorrência da reação. Contudo, a inclusão da MP no ambiente micelar onde há baixa disponibilidade de prótons abaixa significativamente a eficiência catalítica da MP e a reação passa a ocorrer na escala de segundos (Esquema 1, Eq. 4)⁴. Portanto, o aperfeiçoamento do catalisador MP/CTAB requeria a presença de um doador de prótons e passamos a investigar o sistema na presença de histidina. Porém, no sistema formado por micelas de CTAB mais MP, a histidina por coordenar com o ferro hemínico no ambiente restrito da micela, funcionou como um inibidor competitivo da reação com peróxidos. Esse problema foi contornado substituindo micelas de CTAB por lipossomos de DODAB, os quais, sendo igualmente capazes de proporcionar uma interface alcalina, permitiam que a histidina ficasse afastada do ferro hemínico e pudesse atuar apenas como doadora de prótons.



No presente estudo comparamos a atividade catalítica de MnMP em meio homogêneo, em micelas de CTAB e lipossomos de DODAB na presença e na ausência de histidina.

Nesse sistema, devido à substituição do ferro por manganês que possui menor afinidade pelo grupo imidazol da histidina, permitiu que a mesma não mais atuasse como inibidora da reação, mas ao contrário, a favorecesse como doadora de prótons.

Quando Fe(III)-MP é substituída por Mn(III)-MP, a adição de peróxido de hidrogênio, na presença e na ausência de histidina, leva a mudanças espectrais sugestivas da conversão do catalisador para Composto II, com o subsequente *bleaching* parcial do cromóforo. Entretanto, a presença de histidina acelerou a reação em ambos os meios: homogêneo e heterogêneo (Fig. 1 A e B), provavelmente porque, nestas condições, a histidina pode atuar como catalisador ácido/base. A velocidade de conversão da Mn(III)MP-11 para Composto II (k_{obs}) em meio homogêneo e monitorado pela diminuição da banda de transferência de carga em 463 nm, aumentou de $2,5 \text{ ms}^{-1}$ para $4,2 \text{ ms}^{-1}$.

A velocidade de conversão da Mn(III)MP-11 para Composto II (k_{obs}) em micelas de CTAB e monitorada pela diminuição da banda de transferência de carga em 463 nm, aumentou de 5 ms^{-1} to 25 ms^{-1} . Portanto, micelas de CTAB aumentam a velocidade de reação de MnMP-11 com peróxido de hidrogênio e, neste meio, o efeito da histidina é mais acentuado. Este resultado é coerente, uma vez que, em micelas de CTAB, a histidina fica mais próxima do centro catalítico, sendo um eficiente catalisador ácido/base.

A presença de histidina acelerou a velocidade da reação de MnMP também em lipossomos de DODAB, porém nesse sistema, o *bleaching* do cromóforo que acompanha o ciclo catalítico foi muito menor e isso se deve provavelmente ao maior distanciamento entre a porfirina, a histidina e os radicais livres gerados na bicamada do lipossomo.

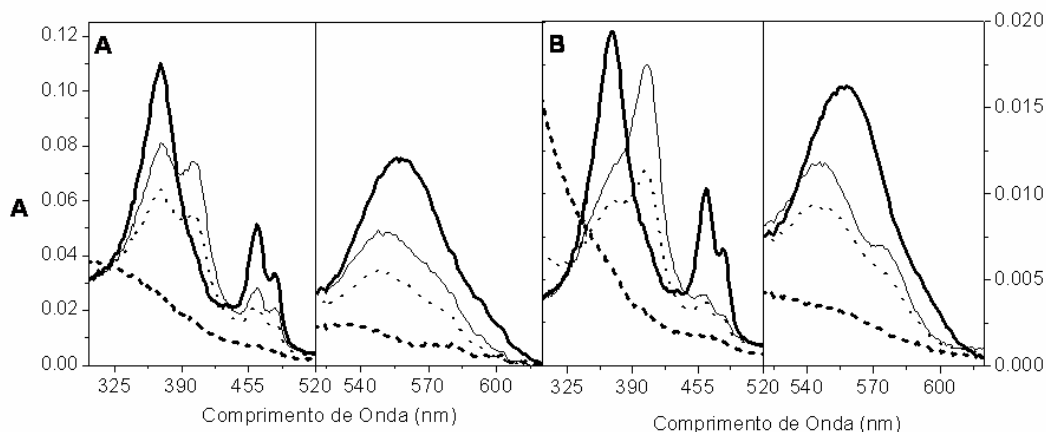


Figura 1. **A** – Espectro da absorvância de $1.13 \mu\text{M}$ Mn(III)MP-11 durante a reação com 352 de excesso de HOOH em 20 mM CTAB pH 10.4, tempo inicial (linha grossa), 92 s (linha fina), 166 s (linha pontilhada) e 15 min (linha tracejada) depois da adição de peróxido de hidrogênio. **B**- Espectro da Absorvância de $1.13 \mu\text{M}$ Mn(III)MP-11 durante a reação com 352 de excesso de HOOH em 20 mM CTAB em tampão 5 mM Histidina pH 10,4, tempo inicial (linha grossa), 102s (linha fina), 170s (linha pontilhada) e 15 min (linha tracejada) depois da adição de peróxido de hidrogênio.

CONCLUSÃO

As micelas de CTAB favorecem a formação de Composto II porque criam uma interface alcalina com baixa concentração de prótons que atuam como inibidores competitivos do catalisador, porém este sistema carece de um catalisador ácido base, papel esse desempenhado pela histidina adicionada. A histidina foi eficiente somente em condições nas quais a coordenação com o metal central foi desfavorecida, isto é, substituindo micelas de CTAB por lipossomos de DODAB, no caso de FeMP ou substituindo ferro por manganês que não coordena com a histidina. As MPs podem ter a atividade finamente modulada por micelas e lipossomos devido a diferentes partições dos substratos e catalisadores nas mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, D. A.; MABUYA, M. B.; MARQUES, H. M. Heme and hemoproteins. Part 4. Preparation, analysis, and solution chemistry of microperoxidase 9 - comparison with microperoxidase 8. **S. Afr. Chem.**, v. 40, n. 2, p. 103-110, 1986.

WANG, J. S.; BAEK, H.K.; VAN WART, H.E. High valent intermediates in the reaction of *N* alpha acetyl microperoxidase-8 with hydrogen peroxides models for compounds 0, I and II of horseradish peroxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.179, n. 3, p. 1320-1324, setembro 1991.

PRIMUS, J.L.; GRUNENWALD, S.; HAGEDOORN, P.L.; ALBRECHT-GARY, A.-M.; MANDON, D.; VEEGER, C. J. The Nature of the Intermediates in the reactions of Fe(III)- and Mn(III)-Microperoxidase-8 with HOOH: a Rapid Kinetics Study. *Am. Chem. Soc.* 2202 (2001), 124, 1214-1221.

PRIETO T., NASCIMENTO O.R., TERSARIOL I.L.S., FALJONI-ALARIO A., NANTES I.L. Microperoxidase-8 associated to CTAB micelles: a new catalyst. *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 11124–11132.

BAEK, H. K.; VAN WART, H. E. Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. **Biochemistry**, v. 28, n. 14, p. 5714-9, julho 1989.

PRIETO T., NASCIMENTO O.R., TERSARIOL I.L.S., FALJONI-ALARIO A., NANTES I.L. Microperoxidase-8 associated to CTAB micelles: a new catalyst. *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 11124–11132.

BAEK, H. K.; VAN WART, H. E. Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. **Biochemistry**, v. 28, n. 14, p. 5714-9, julho 1989.