

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas



Guilherme Amoglia Priori

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATECOLASE DE UM COMPLEXO
CONTENDO ÍONS Cu^{+2}**

Rio de Janeiro

2019

RESUMO
PROJETO DE CURSO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATECOLASE DE UM COMPLEXO CONTENDO ÍONS Cu^{+2}

ALUNO: Guilherme Amoglia Priori

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Annelise Casellato. DQI – Instituto de Química – UFRJ

DATA DA DEFESA: 11/03/2019

PALAVRAS-CHAVE: Catecol oxidase, avaliação de reatividade, complexo mononuclear de Cu (II)

A catecol oxidase (CaOx) é uma enzima de cobre do tipo-3, encontrada em plantas, crustáceos e insetos, responsável pela catalise da oxidação de o-difenóis, ou catecois, a suas respectivas o-quinonas através de uma reação de oxidação do dioxigênio a água em um processo conhecido como atividade de catecolase. Moléculas mais simples, de baixo peso molecular, inspirados nos sítios ativos de metaloenzimas, possuem alto potencial de simulação da atividade da enzima de interesse. Nesta perspectiva, foi realizada a avaliação da atividade de catecolase frente a oxidação do substrato 3,5-DTBC e estudada a ativação do oxigênio do complexo [Bis-N-(2-hidroxietil)salicilaldiminato]cobre(II). Para estudar a ativação de oxigênio foi utilizada a técnica de análise de voltametria cíclica. Tal análise indicou a possível capacidade da eletroredução do O_2 . Além disso, foram avaliados a influência do pH na degradação do substrato e a influência da concentração do substrato na velocidade inicial da reação. Foram obtidas as constantes cinéticas preliminares pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten e foi observado um aumento na atividade catalítica em pHs acima de 8,5, porém não foi observada uma tendência a saturação.

Autorizamos a divulgação no Repositório Institucional da UFRJ-Pantheon

Aluno: _____ Orientador: _____

Assinatura

Assinatura

Guilherme Amoglia Priori

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATECOLASE DE UM COMPLEXO
CONTENDO ÍONS Cu^{+2}**

Projeto de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas sob orientação da Prof^a. Dr^a. Annelise Casellato.

Rio de Janeiro

2019

Projeto de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas. Qualquer citação deverá atender às normas éticas científicas.

Guilherme Amoglia Priori

Projeto de Curso apresentado em 11/03/2019

Prof^a. Dr^a. Annelise Casellato

Prof^a. Dr^a. Nadia Maria Comerlato

Prof^a. Dr^a. Marta Eloísa Medeiros

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo o suporte dado, tornando minha formação possível.

A minha orientadora, Annelise Casellato, por me aceitar como aluno de iniciação científica, pela paciência em entender minhas ausências necessárias no laboratório em tempos de crise, e por continuar acreditando no meu trabalho.

Aos meus amigos Igor Vogel e Mariana Telles, por escutarem.

A Rodolfo Inés e Juliana Goulart, pela disponibilidade do laboratório de fotoquímica, e a Fagner Moura, pelo apoio na realização das análises de voltametria.

A Cássia Curan Turci, ao Centro Acadêmico do Instituto de Química - CAIQ, especialmente a gestão de Rafael Campos, e ao Núcleo de Diversidade do Instituto de Química – NuDIQ, pelo apoio e auxílio na construção do Projeto PsiQ, que me permitiu travar um debate com a comunidade acadêmica sobre a importância do cuidado com a saúde mental na universidade, podendo ajudar diversos colegas nesse processo.

Aos meus vários colegas de UFRJ, que tornaram meu tempo na graduação menos difícil.

“Nature holds the key to our aesthetic,
intellectual, cognitive and even spiritual
satisfaction”

Edward O. Wilson

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição específica dos metais nas organelas de uma célula eucariótica (HARE et al., 2015).....	2
Figura 2 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-1 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).....	7
Figura 3 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-2 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).....	8
Figura 4 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-3 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).....	8
Figura 5 - Reações de oxidação catalisadas pela tirosinase e pela catecol oxidase	12
Figura 6 - Redução aquosa do O ₂ e seus intermediários (QUIST et al., 2017), adaptado.....	13
Figura 7 - Estrutura geral da ibCO. Os átomos de cobre são mostrados em laranja, as α-helices em azul, as folhas β em verde e as pontes disulfeto em amarelo (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).....	15
Figura 8 - (A) esfera de coordenação do centro de cobre da CaOx no estado met, (B) interação do inibidor PTU com a CaOx (KOVAL et al., 2006).....	16
Figura 9 - Mecanismo proposto para a atividade de catecolase da CaOx e Ty (QUIST et al., 2017), adaptado.....	16
Figura 10 - Esquema de Briggs-Haldane.....	19
Figura 11 - Representação da síntese do LCu.....	22
Figura 12 – Esquema da catalise oxidativa do 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ.....	23
Figura 13 – Voltamogramas Cíclicos obtidos para o complexo CuL em atmosfera de nitrogênio (vermelho),e em atmosfera de O ₂ (preto) na faixa de potencial -1,5 V à 1,5 V, em solução de TBAPF ₆ 0,1 mol L ⁻¹ em DMSO com velocidade de varredura: de 100 mV, carbono vítreo:calomelano:platina:.....	26
Figura 14 - Dependência da velocidade inicial da reação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo LCu. Condições: [C] _{final} ≈ 6,57 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [T] _{final} ≈ 3,03 x 10 ⁻¹ mol L ⁻¹ , [S] _{final} ≈ 1,01 x 10 ⁻² mol L ⁻¹	27
Figura 15 - Dependência da velocidade da reação do 3,5-DTBC com a variação da concentração de substrato para o complexo LCu. Condições: [C] _{final} ≈ 9,5 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [T] _{final} ≈ 3,03 x 10 ⁻¹ mol L ⁻¹ [CHES, pH 10], [S] _{final} ≈ 5,45 x 10 ⁻⁴ – 7,63 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	28

Figura 16 - Dependência da velocidade da reação do 3,5-DTBC com a variação da concentração de substrato para o complexo LCu com ajuste linear de Lineweaver-Burk. Condições: $[C]_{\text{final}} \approx 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[T]_{\text{final}} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ [CHES, pH 10], $[S]_{\text{final}} \approx 5,45 \times 10^{-4} - 7,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição elementar média do corpo humano (adulto, 70 kg) (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)	2
Tabela 2 – Principais enzimas de cobre e suas funções (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)	9
Tabela 3 - Interconexão entre as enzimas de cobre e ferro (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)	11
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos preliminares obtidos pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten e pelo ajuste linear de Lineweaver-Burk	29
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos da oxidação do 3,5-DTBC catalisado por complexos reportados nos últimos anos (ROCHA et al., 2016).....	30

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

MeOH – metanol

CaOx – Catecol oxidase

LCu - [Bis-N-(2-hidroxietyl)salicilaldiminato]cobre(II)

CHES - ácido 2-[N-cicloexilamino]etanosulfônico

MES - ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfônico

HEPES - ácido 2-[4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazino]-etanossulfônico

K_{ass} - constante de associação

k_{cat} - constante catalítica

K_M - constante de Michaelis-Menten

V₀ - velocidade inicial

V_{máx} - velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O cobre em meio biológico.....	4
1.2. Metaloenzimas de cobre	6
Tipo-1	7
Tipo-2	7
Tipo-3	8
1.3. Ativação de oxigênio	12
1.4. Catecol Oxidase.....	13
1.5. Compostos miméticos à enzima catecol oxidase	17
1.6. Estudo cinético – Modelo de Michaelis-Menten.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1. Síntese do complexo [Bis-N-(2-hidroxietil)salicilaldiminato]cobre(II).....	22
3.2. Voltametria cíclica	22
3.3. Avaliação da atividade de catecolase.....	22
3.3.1. Estudo do efeito de pH	23
3.3.2. Estudo do efeito da concentração de substrato	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Voltametria Cíclica	25
4.2. Avaliação da atividade de catecolase.....	27
4.2.1. Estudo do efeito de pH	27
4.2.2. Estudo do efeito da concentração de substrato	28
5. CONCLUSÕES.....	32

6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

Seis elementos constituem cerca de 98,5% em peso da composição elementar do corpo humano, sendo: carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, cálcio e fósforo. No entanto, existem cerca de 22 a 30 elementos que são essenciais a praticamente todos os organismos vivos. Alguns destes elementos estão presentes em altas concentrações, como sódio, potássio e magnésio, enquanto outros, como ferro, cobalto, manganês, molibdênio, zinco e cobre, chamados de elementos traço, se encontram em concentrações muito baixas no organismo. Mas, ainda assim, estes elementos são essenciais a vida (CRICHTON, 2012).

A terra tem cerca de 4,5 bilhões de anos. Os fósseis mais antigos, de seres que contém a morfologia similar as algas azuis modernas, datam de 3,5 bilhões de anos e evidências indiretas levam a crer que a vida surgiu a cerca de 3,8 bilhões de anos (ORGEL, 1998), tendo sua origem em fontes termais presentes nos oceanos. Os elementos essenciais à vida não foram escolhidos por sua abundância no universo e, sim, com base na sua biodisponibilidade e nas possíveis funções que apresentavam em um ambiente aquoso (CRICHTON, 2012). Nos bilhões de anos desde a sua origem, a vida evoluiu através de uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos. Compostos orgânicos como aminoácidos, vitaminas, carboidratos e nucleotídeos, por exemplo, são essenciais na produção de macromoléculas como proteínas e material genético, podendo ser biosintetizados e degradados pelos organismos vivos, enquanto compostos inorgânicos, como os diversos metais essenciais à vida não são sintetizados nem degradados, o que faz com que a regulação de suas quantidades em um ser vivo tenha um controle rígido (FESTA; THIELE, 2011).

Os metais são encontrados em todas as células, distribuídos de forma heterogênea entre os órgãos e organelas. São comumente encontrados em alta concentração em estruturas onde são mais necessários, especialmente em órgãos com grande atividade metabólica, como o cérebro (HARE et al., 2015). Na figura 1, pode ser vista a distribuição específica dos metais nas organelas de uma célula eucariótica e na tabela 1, a composição elementar média do corpo humano.

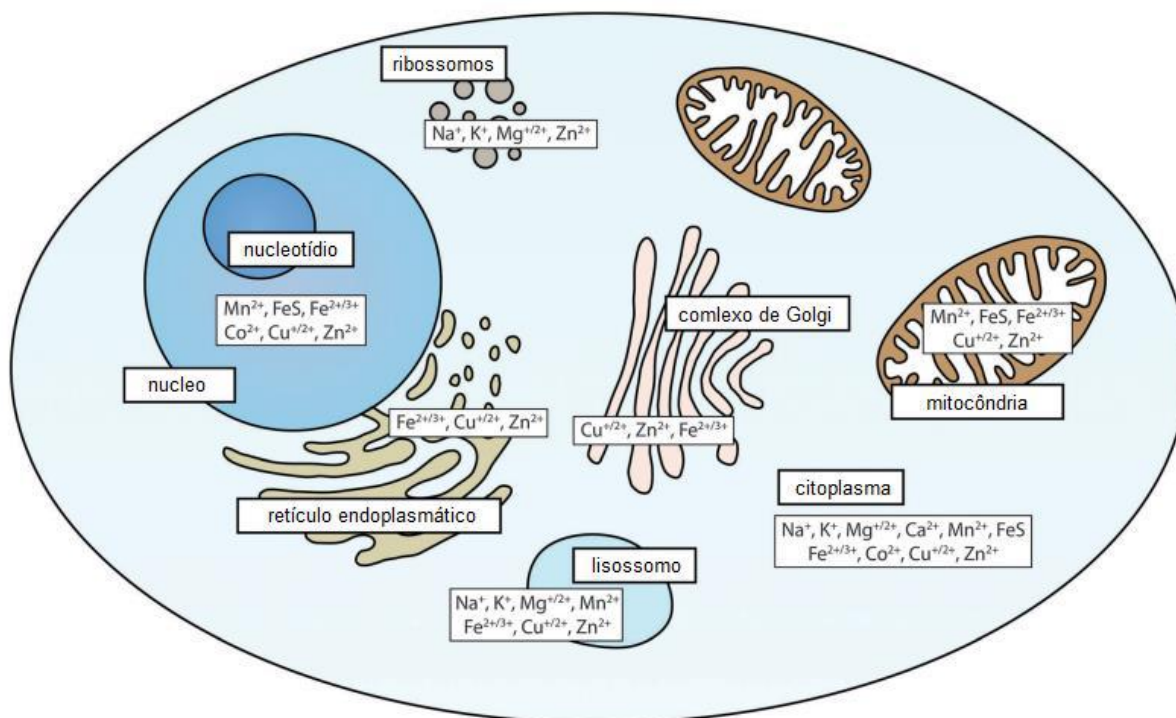


Figura 1 - Distribuição específica dos metais nas organelas de uma célula eucariótica (HARE et al., 2015).

Tabela 1 - Composição elementar média do corpo humano (adulto, 70 kg) (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Elemento	Símbolo	Massa (g)
Oxigênio	O	43000
Carbono	C	16000
Hidrogênio	H	7000
Nitrogênio	N	1800
Cálcio	Ca	1200
Fósforo	P	780
Enxofre	S	140
Potássio	K	125
Sódio	Na	100
Cloro	Cl	95
Magnésio	Mg	25
Flúor	F	5,0 (var)
Ferro	Fe	4,0

Zinco	Zn	2,3
Silício	Si	1,0 (var)
Titânio^a	Ti	0,70
Rubídio^a	Rb	0,68
Estrôncio^a	Sr	0,32
Bromo^a	Br	0,26
Chumbo^b	Pb	0,12
Cobre	Cu	0,07
Alumínio^a	Al	0,06
Cério^a	Ce	0,04
Estanho^b	Sn	0,03
Bário^a	Ba	0,02
Cadmio	Cd	0,02 (var)
Boro^b	B	0,018
Níquel	Ni	0,015
Iodo	I	0,015
Selênio	Se	0,014
Manganês	Mn	0,012
Arsênio^b	As	0,007 (var)
Lítio^a	Li	0,007
Molibdênio	Mo	0,005
Cromo	Cr	0,002 (var)
Cobalto	Co	0,002

a = não essenciais, *b* = caráter essencial ainda não definido

Metais apresentam diversos tipos de atividades biológicas, podendo agir como toxinas ou remédios, ou em funções vitais dos seres vivos, sendo indispensáveis à vida. Possuem um papel fundamental na biologia, visto que muitas reações bioquímicas dependem diretamente da presença de metais, que muitas das vezes se encontram coordenados de forma específica devido à fácil interação entre metais e aminoácidos, criando novas e específicas estruturas junto a proteínas (MIESSLER; TARR, 2004). Estima-se que metade de todas as enzimas e um terço de todas as proteínas humanas necessitem de metais para sua estrutura e função. A reatividade

dos metais nos seres vivos está diretamente ligada à natureza do ligante com o qual o metal interage, assim como seu ambiente redox, influenciando diretamente a quantidade de papéis que tal metal tenha nas reações biológicas. Por exemplo, ligantes coordenados ao ferro afetam seu estado de oxidação e, conseqüentemente, sua configuração eletrônica, influenciando diretamente, assim, em sua reatividade. Tais características determinam diretamente se o complexo de ferro, por exemplo, terá uma atividade de transferência, transporte e estocagem de oxigênio ou na conversão enzimática de pequenas moléculas (HARE et al., 2015).

Os grandes esforços para aumentar o entendimento de reações bioquímicas levou à descoberta da função biológica específica de certos elementos tradicionalmente classificados como inorgânicos. A Química Bioinorgânica é uma área de pesquisa interdisciplinar dedicada ao estudo dos metais nos organismos vivos, com rápido desenvolvimento e importantes contribuições nas áreas de medicina, biologia, farmacologia, toxicologia, ambiental, agrícola e muitas outras (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

1.1. O cobre em meio biológico

O cobre é considerado um elemento traço na biologia, sendo o terceiro metal traço mais abundante no corpo humano, atrás somente do ferro e zinco. Este elemento é essencial aos sistemas vivos e está presente em praticamente todos os tecidos do corpo humano. É estocado preferencialmente no fígado, sendo encontrado no corpo humano em uma quantidade de cerca de 75-100 miligramas (OSREDKAR; SUSTAR, 2011).

Seres humanos não necessitam de cobre na sua função respiratória como outros seres vivos. No entanto, sua deficiência ou abundância podem causar diversas doenças como a doença de Wilson, onde o metal se acumula no fígado e no cérebro, podendo causar demência e morte; a síndrome de Menkes, com ocorrência principalmente em recém nascidos, onde ocorre uma má distribuição do cobre no corpo, causando o acúmulo deste metal em áreas como intestino e rins, e falta no cérebro e fígado, causando, entre outros, deficiência no desenvolvimento e defeito no sistema nervoso; mutações na enzima superóxido dismutase estão ligadas a doenças neurodegenerativas, como doença de Lou Gehrig e esclerose lateral amiotrófica; e o

cobre também está associado a doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

Devido ao seu potencial redox, o cobre é comumente encontrado no centro ativo de metaloenzimas, que se fazem necessárias em processos biológicos como a respiração, a formação de pigmentos, a biossíntese de neurotransmissores, transporte de ferro, a proteção contra estresse oxidativo, na amidação de peptídeos e na maturação do tecido conjuntivo (CUILLEL, 2009).

A disponibilidade dos metais nos organismos mudou conforme a evolução das diferentes espécies e as mudanças no ambiente em que tais espécies evoluíram (WALDRON et al., 2009). Acredita-se que a cerca de 2,7 bilhões de anos a atmosfera terrestre ainda era bastante redutora, contendo gases como H_2O , NH_3 , CH_4 e H_2S . Neste ambiente, os seres vivos utilizavam principalmente íons solúveis de Fe^{+2} e Mn^{+2} , enquanto o cobre era encontrado principalmente na forma de sulfatos, óxidos e carbonatos muito pouco solúveis. Com o surgimento dos primeiros organismos fotossintéticos, como as primeiras cianobactérias, houve, a cerca de 10^9 anos atrás, um acúmulo de oxigênio na atmosfera e nos oceanos, transformando a atmosfera em um ambiente oxidante. Tal fato levou a um favorecimento na mudança do estado de oxidação dos diversos metais, aumentando a presença de cobre solúvel e, assim, seu uso pelos sistemas vivos (CUILLEL, 2009). O aparecimento de uma concentração significativa de oxigênio na atmosfera levou cerca de 200-300 milhões de anos após o surgimento dos primeiros organismos fotossintéticos, devido ao fato de que este oxigênio era consumido na oxidação de ferro nos oceanos e na superfície terrestre (RENSING; GRASS, 2003).

A presença de oxigênio na atmosfera criou nos seres vivos a necessidade de um metal que pudesse trabalhar com o potencial de oxidação entre 0 e 0,8 V. O potencial redox do $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$ é mais alto do que o potencial $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, o que fez com que o aumento da disponibilidade de cobre nesta fase do planeta possibilitasse a evolução de novas enzimas que trabalhassem com altos potenciais redox, entre 0,25 e 0,75 V. O potencial mais alto pode ser usado na oxidação direta de substratos facilmente oxidáveis, como superóxidos, ascorbatos, fenolatos e catecóis (RENSING; GRASS, 2003). Devido a sua biodisponibilidade tardia na evolução da vida, o cobre é comumente encontrado em espaços extracelulares, enquanto o ferro é mais presente no interior das células (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

Um dos fatores para o uso do cobre ter se tornado biologicamente favorável é sua existência nos estados de oxidação Cu^{+1} e Cu^{+2} . As diversas enzimas de cobre fazem uso desta fácil interconversão entre seus dois estados de oxidação principalmente para transporte de elétrons e de oxigênio (OSREDKAR; SUSTAR, 2011). Cu (II) forma complexos com número de coordenação 4, 5 ou 6, formando, entre os metais bivalentes, os complexos mais estáveis, enquanto o Cu^{+1} mostra preferência por formar complexos com número de coordenação 2, 3 ou 4, e ambos se coordenam rapidamente aos seus ligantes. Os complexos de Cu^{+1} com número de coordenação 4 são tetraédricos, enquanto o complexo equivalente de Cu^{+2} é quadrado planar (CRICHTON, 2012). Cu^{+1} mostra preferências de ligação com grupamentos tioeter e tiol, presentes em aminoácidos como a cisteína e metionina, enquanto Cu^{+2} mostra grande afinidade por oxigênio e por grupos de nitrogênio de imidazol, presentes no ácido aspártico e ácido glutâmico, ou no aminoácido histidina, fazendo com que o cobre possa interagir de forma ampla com diversas proteínas diferentes, dando a elas formas e possibilidades de reações bioquímicas (FESTA; THIELE, 2011).

1.2. Metaloenzimas de cobre

Uma das condições fundamentais para a vida é a capacidade de catalisar reações. Sem a catálise, reações importantes para a vida não ocorrem em uma taxa necessária para sua manutenção. Os catalisadores nos sistemas biológicos são as enzimas, proteínas altamente especializadas, com um alto grau de preferência por substratos específicos e com grande capacidade catalítica, sendo centrais a todo processo bioquímico (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas, com exceção de alguns RNAs catalíticos. A atividade catalítica destas moléculas depende diretamente da sua estrutura e das condições do sistema. Assim como qualquer proteína, enzimas possuem massa molecular de 12 mil a 1 milhão de Daltons e as reações com o substrato acontecem em uma pequena parte no interior da enzima, chamado de centro ativo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Proteínas contendo cobre em seu centro ativo estão presentes nos três domínios da vida e são, em geral, responsáveis por uma variedade de processos envolvendo catálise redox, como o transporte de oxigênio, a regulação de neurotransmissores, e

na respiração celular. As metaloenzimas de cobre podem ser classificadas de acordo com suas características espectroscópicas e estrutura do centro ativo (AGUILERA, F; MCDOUGALL, C; BEGNAN, 2013). Os tipos são:

Tipo-1 - São conhecidas por “centros azuis de cobre” devido a uma intensa cor azul na sua forma oxidada, que aparece devido a banda de transferência de carga em 600 nm do enxofre da cisteína para o centro de Cu^{+2} . Em geral, a esfera de coordenação ao redor do centro de cobre neste tipo de enzima é constituída de dois nitrogênios doadores de elétrons de dois resíduos de histidina, enxofre proveniente de um resíduo de cisteína e um enxofre fracamente coordenado proveniente de um resíduo de metionina, na maioria dos casos (figura 2) (KOVAL et al., 2006). A cristalografia deste tipo de enzima indica que o centro metálico possui uma esfera de coordenação tetraédrica distorcida, com variação de até 22° do ângulo ideal (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

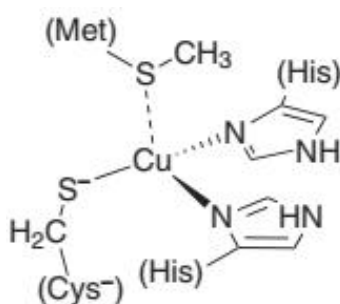


Figura 2 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-1 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Tipo-2 - As proteínas que possuem o centro ativo do tipo-2 são conhecidas como proteínas “normais” de cobre. Este nome é historicamente baseado nas análises de EPR destas enzimas, indicando a similaridade com complexos comuns de Cu^{+2} . A forma oxidada destas enzimas gera uma coloração azul clara, referente a transição $d-d$ do complexo de Cu^{+2} . A esfera de coordenação destas enzimas é normalmente constituída de átomos de nitrogênio e/ou oxigênio, e possui geometria quadrado-planar ou tetraédrica distorcida (figura 3) (KOVAL et al., 2006).

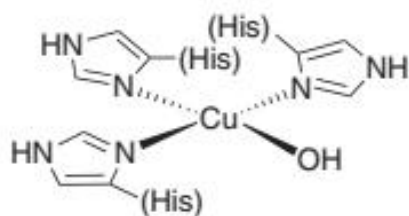


Figura 3 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-2 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Tipo-3 - Proteínas do tipo-3 são, em geral, enzimas do tipo oxigenase/oxidase ou proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002). O centro ativo geralmente é binuclear de cobre, Cu(A) e Cu(B), onde cada átomo de cobre é circundado por três átomos de nitrogênio de resíduos de histidina (figura 4). Uma característica muito importante deste tipo de proteínas é sua capacidade de se ligar a oxigênio em condição ambiente. O cobre (II) na forma oxidada destas proteínas tem característica fortemente antiferromagnética, o que explica a falta de sinal em análises de EPR deste tipo de proteína (KOVAL et al., 2006).

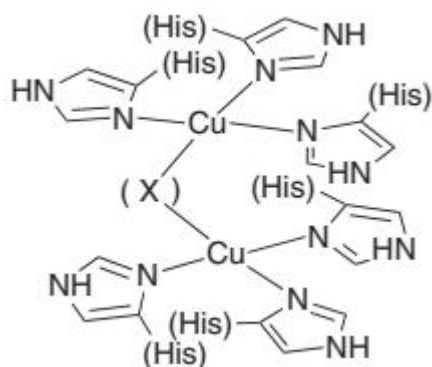


Figura 4 - Esfera de coordenação geral de uma enzima do tipo-3 (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Na tabela 2 são mostradas as principais enzimas de cobre e suas funções.

Tabela 2 – Principais enzimas de cobre e suas funções (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Função e enzimas típicas	Massa molecular (kDa)	Tipo de centro de cobre	Ocorrência
Transferência de elétrons ($\text{Cu}^{+1} \leftrightarrow \text{Cu}^{+2} + \text{e}^-$)			
Plastocianina	10,5	1 tipo-1 ($E = 0,3 - 0,4\text{V}$)	Participação em fotossíntese vegetal
Azurina	15	1 tipo-1 ($E = 0,2 - 0,4\text{V}$)	Participação em fotossíntese bacteriana
Oxidases “azuis” ($\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$)			
Lacase	60 - 140	1 tipo-1 ($E = 0,4 - 0,8\text{V}$) 1 trimer	Oxidação de polifenóis e poliaminas em plantas
Ascorbato oxidase	2 x 75	2 tipo-1 ($E = 0,4\text{V}$) 2 trimers	Oxidação de ascorbato para desidroascorbato em plantas
Ceruloplasmina	130	2 tipo-1 ($E = 0,4\text{V}$) 1 trimer	Transporte e estocagem de Cu, mobilização e oxidação de Fe, Oxidase e função antioxidante em soro humano e animal
Oxidases “não azuis” ($\text{O}_2 \rightarrow 4 \text{H}_2\text{O}_2$)			
Galactose oxidase	68	1 tipo-2	Oxidação de álcool em fungos
Amino oxidase	> 70	1 tipo-2	Degradação de aminas a carbonila Ligação cruzada de colágeno
Monoxigenase ($\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{substrato oxidado}$)			
Dopamina β-monooxigenase	4 x 70	8 tipo-2	Oxidação de dopamina de cadeia lateral para norepinefrina no córtex adrenal
Tirosinase	42	2 tipo-3	Orto-hidroxilação de fenóis e oxidação subsequente a o-quinonas

Dioxigenases ($O_2 \rightarrow 2$ substrato oxidado)			
Quercetase	110	2 tipo-2	Clivagem oxidativa da quercetina em fungos
Oxidase terminal ($O_2 \rightarrow 2 H_2O$)			
Citocromo c oxidase	> 100	Cu _A Cu _B	Final da cadeia respiratória
Degradação de superóxido ($2 O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + O_2^{2-}$)			
Cu, Zn Superóxido dismutase	2 x 16	2 tipo-2	Disproporcionamento de $O_2^{\cdot-}$
Transporte de oxigênio			
Hemocianina	n x 50 (moluscos) n x 75 (artrópodes)	2 tipo-3 por n	Transporte de oxigênio em hemolifina de moluscos e artrópodes
Funções no ciclo do nitrogênio			
Nitrito redutase	3 x 36	3 tipo-1 3 "tipo-2"	Redução de NO_2^-
N₂O redutase	2 x 70	2 Cu _A 4 Cu _Z	Redução de N ₂ O a N ₂ no ciclo do nitrogênio

Existe um paralelo entre as enzimas de cobre e as enzimas de ferro, com funções comparáveis entre as duas (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013). Algumas podem ser vistas na tabela 3:

Tabela 3 - Interconexão entre as enzimas de cobre e ferro (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013)

Função	Proteína de Fe	Proteína de Cu
Transporte de O₂	Hemoglobina (<i>h</i>)	Hemocianina
	Hemeritrina (<i>nh</i>)	
Oxigenação	Citocromo P-450 (<i>h</i>)	
	Metano monooxigenase (<i>nh</i>)	Tirosinase
	Catecol dioxigenase (<i>nh</i>)	Quercetase
Oxidase	Peroxidasas (<i>h</i>)	Amino oxidases
	Peroxidasas (<i>nh</i>)	Lacase
Transferência de elétrons	Citocromos	Proteínas azuis de cobre
Função antioxidante	Peroxidasas (<i>h</i>)	Superoxido dismutase
	Superoxido disutase bacteriano (<i>nh</i>)	(Cu, Zn) dos eritrócitos
Redução de NO⁻²	Nitrito redutase (<i>h</i>)	Nitrito redutase contendo Cu

h = sistema *heme*, *nh* = sistema *não-heme*

São três os tipos conhecidos de enzimas contendo um único centro do tipo-3: Hemocianina (Hc), tirosinase (Ty) e catecol oxidase (CaOx) (TISHCHENKO et al., 2016). Todas estas proteínas possuem um centro ativo binuclear parecido e são igualmente capazes de se ligar ao oxigênio. No entanto, cada uma delas difere na sequência de aminoácidos em sua composição, o que afeta a acessibilidade do substrato ao centro ativo (AGUILERA, F; MCDUGALL, C; BEGNAN, 2013).

A hemocianina é uma proteína do sistema respiratório dos artrópodes (~75 kDa) e moluscos (~750 kDa) responsável pelo transporte e/ou estoque de oxigênio, enquanto a tirosinase é mais comumente encontrada em fungos e vertebrados, e possui duas atividades catalíticas principais: a hidroxilação de monofenóis (como a tirosina) aos o-difenóis (atividade de creolase) e a oxidação de o-difenóis para o-quinonas (atividade de catecolase), como visto na figura 5 (EICKEN; KREBS; SACCHETTINI, 1999). Tirosinase e catecol oxidase são normalmente chamadas de fenoloxidasas, uma vez que ambas oxidam compostos fenólicos. A tirosina oxida monofenóis e o-difenóis, enquanto a catecol oxidase oxida somente o-difenóis (SOLEM; TUCZEK; DECKER,

2016). As particularidades da catecol oxidase serão discutidas com mais profundidade posteriormente neste trabalho.

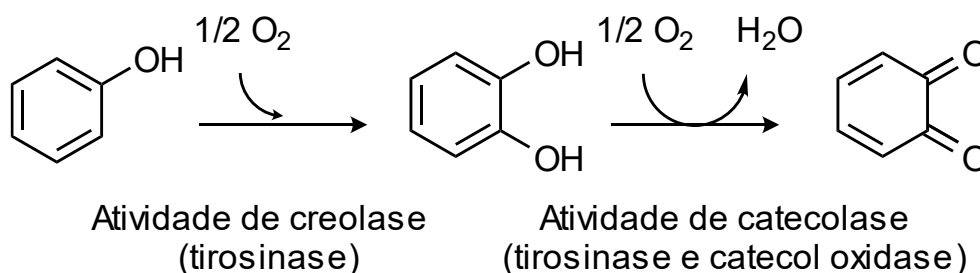


Figura 5 - Reações de oxidação catalisadas pela tirosinase e pela catecol oxidase

As diferenças no centro ativo de proteínas de cobre de tipo-3 possibilitaram a diversificação do uso destas proteínas em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo o transporte de oxigênio em moluscos e artrópodes, cura de feridas e na síntese do pigmento melanina em uma variedade de metazoários, atuando também no brilho de frutas e vegetais. Imagina-se que algumas das reações catalisadas por catecol oxidases e tirosinases são importantes na proteção de plantas e animais pela formação de estruturas que contêm melanina que podem encapsular patógenos invasores. As tirosinases também contribuem na calcificação de estruturas, como conchas de moluscos e exoesqueletos de artrópodes (AGUILERA, F; MCDUGALL, C; BEGNAN, 2013).

1.3. Ativação de oxigênio

O oxigênio é utilizado pela natureza como o principal oxidante na transformação de biomoléculas. A ativação do oxigênio é um processo central e muito importante na biologia, na indústria e na química sintética. O processo de ativação passa por vários intermediários, como superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (QUIST et al., 2017), conforme mostrado na Figura 6:

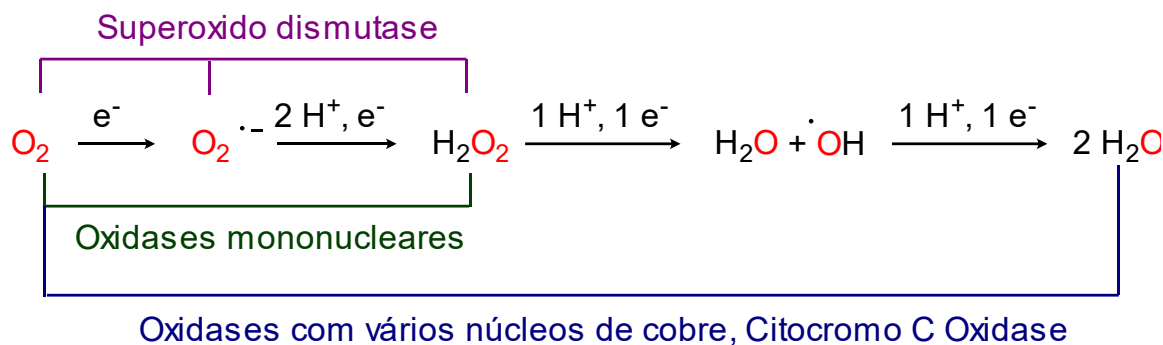


Figura 6 - Redução aquosa do O_2 e seus intermediários (QUIST et al., 2017), adaptado

Metaloenzimas de cobre ativam O_2 para realizar uma grande variedade de funções biológicas. As monooxigenases oxidam o substrato em um processo que envolve 4 elétrons, incorporando um átomo de oxigênio da molécula de O_2 ao substrato, convertendo o segundo átomo a água. Tais enzimas de cobre contém um ou dois íons de cobre, conjugados ou não, em seu centro ativo. Dioxigenases oxidam o substrato incorporando os dois átomos da molécula de O_2 no produto. Deste tipo, somente foi descrita até hoje uma enzima de cobre. As oxidases, através da transferência de prótons, realizam a redução da molécula de O_2 , utilizando dois elétrons e formando H_2O_2 ou quatro elétrons, produzindo dois equivalentes de H_2O . Geralmente estas enzimas estão associadas a oxidação de um cofator, orgânico ou um íon metálico, ou a outras funções biológicas, como na bomba de prótons do citocromo C oxidase (CcO). Centros ativos mononucleares, homo-multinucleares e hetero-multinucleares de cobre já foram encontrados em enzimas com essa função (QUIST et al., 2017).

1.4. Catecol Oxidase

A catecol oxidase (CaOX) é uma enzima de cobre do tipo-3, normalmente encontrada em plantas, crustáceos e insetos responsável pela catalise da oxidação de o-difenóis, também chamados de catecois, a suas respectivas o-quinonas através de uma reação de oxidação do dioxigênio a água em um processo conhecido como atividade de catecolase. Estas o-quinonas geralmente se auto polimerizam, formando o pigmento melanina (KOVAL et al., 2006).

A CaOX, também conhecida por o-difenol oxidase, foi isolada pela primeira vez em 1937. Nos anos seguintes, foi obtida a partir de uma grande variedade de vegetais e

legumes, como batata e espinafre, e frutas, como maçã e uva. A massa molecular da CaOx varia dependendo do organismo ou do tecido da qual foi obtida, geralmente variando entre 38-45 kDa e 55-60kDa. Foi observada também uma diferença de massa molecular de variedades diferentes de CaOx obtidas a partir do mesmo organismo (KOVAL et al., 2006).

Krebs e colaboradores purificaram e elucidaram a estrutura da CaOx proveniente da *Ipomoea batatas*, batata doce, mostrada na figura 7. A partir da estrutura resolvida e refinada em 2,5 Å do estado *met* nativo (Cu^2Cu^2), foi observado que a enzima possui um formato elipsoidal com dimensões de 55 x 45 x 45 Å³. A estrutura secundária é predominantemente constituída por α -hélices, onde o núcleo da enzima é formado por um feixe de α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$), onde o feixe helicoidal acomoda o centro ativo de cobre, que é circundado por folhas β curtas e pelas $\alpha 1$ e $\alpha 4$, onde cada átomo de cobre está coordenado a 3 resíduos de histidina. Foram obtidas estruturas nos três diferentes estados catalíticos: o estado *met* nativo (Cu^2Cu^2), a forma *deoxy* (Cu^1Cu^1), e a enzima na presença do inibidor feniltioureia (PTU) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

No estado *met* nativo ($\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^{2+}$), os dois átomos de cobre são separados por uma distância de 2,9 Å. Além dos 6 resíduos de histidina, uma molécula de solvente, provavelmente água, completa a esfera de coordenação do metal com geometria de pirâmide trigonal, com comprimento de ligação Cu(A)-O 1,9 Å e Cu(B)-O 1,8 Å. Os dados de EPR mostram um intenso acoplamento antiferromagnético entre os átomos de cobre (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

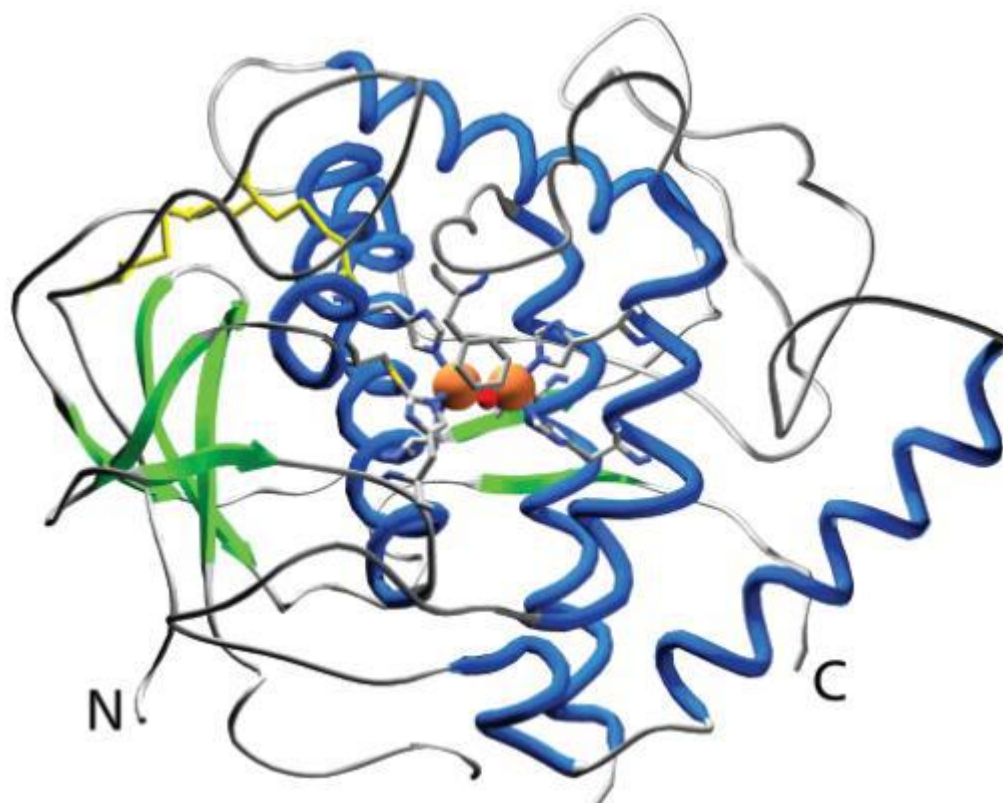


Figura 7 - Estrutura geral da ibCO. Os átomos de cobre são mostrados em laranja, as α -helices em azul, as folhas β em verde e as pontes disulfeto em amarelo (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002)

Na forma *deoxy* (Cu^1Cu^1), devido a redução do cobre, a distância entre os átomos de cobre aumenta para 4,4 Å. Os resíduos de histidina se movem levemente, e nenhuma outra grande mudança foi observada. Há uma mudança no número de coordenação dos átomos de cobre, onde o Cu(A) se mantém com número de coordenação 4, coordenado as três histidinas e ao solvente, e 3 para o Cu(B), agora coordenado somente as 3 histidinas. A esfera de coordenação passa a ser pirâmide trigonal distorcida para o Cu(A) e quadrado planar para o Cu(B) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

Na presença do inibidor PTU, a distância entre os átomos de cobre aumenta para 4,2 Å, com a substituição do solvente na esfera de coordenação do estado *met* pelo enxofre do PTU. A esfera de coordenação dos átomos de cobre se mantém similar à do estado *met*, com mudanças na conformação dos resíduos do centro ativo (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002). A diferença da esfera de coordenação do centro de cobre da enzima no estado *met* e na presença do inibidor PTU pode ser observada na figura 8.

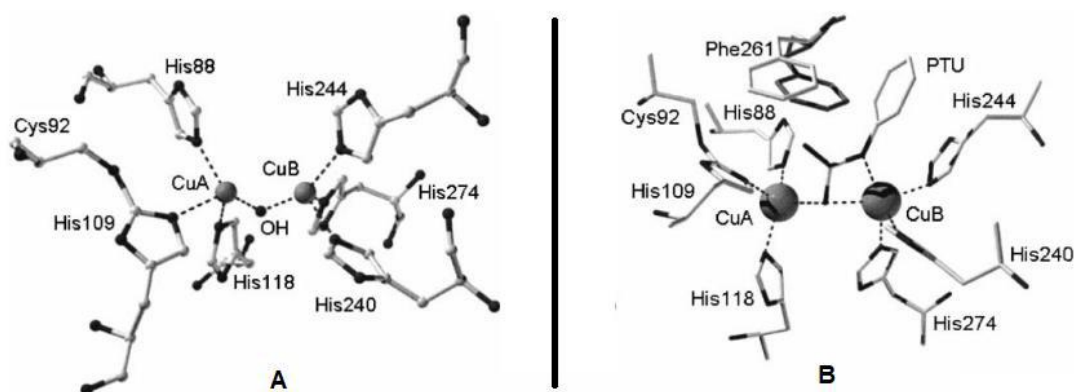


Figura 8 - (A) esfera de coordenação do centro de cobre da CaOx no estado *met*, (B) interação do inibidor PTU com a CaOx (KOVAL et al., 2006)

A oxidação do o-catecol a o-quinase tem duas fases principais, redutora e oxidativa, e necessitam de 1 equivalente de O_2 para cada 2 equivalentes de substrato. Estudos cinéticos indicam que o fator limitante deste ciclo está na transferência de próton (QUIST et al., 2017). Na figura 9 é mostrado o mecanismo proposto para a atividade de catecolase da catecol oxidase e tirosinase.

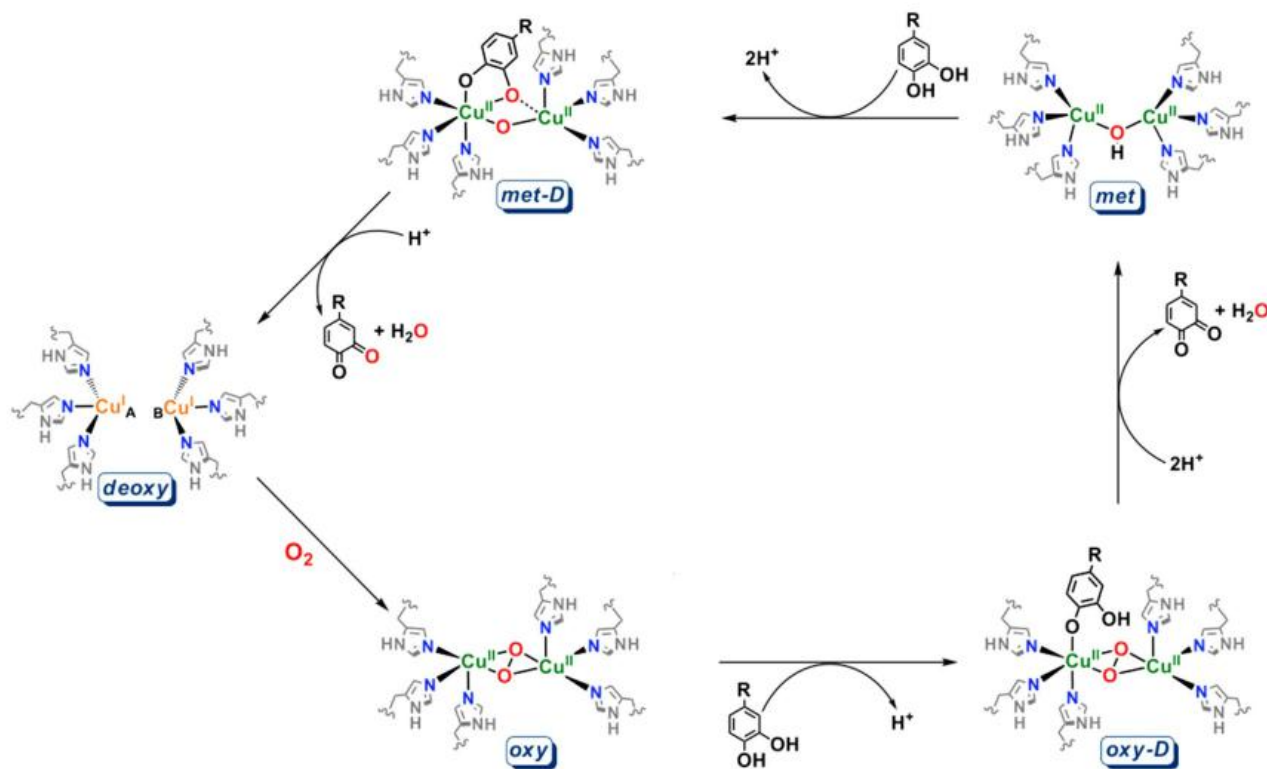


Figura 9 - Mecanismo proposto para a atividade de catecolase da CaOx e Ty (QUIST et al., 2017), adaptado

O ciclo proposto por Krebs e colaboradores inicia com a CaOx na forma *met* nativo ($\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^{2+}$), que inicia a reação com 1 equivalente de um o-catecol, levando a formação de 1 equivalente de o-quinona e na forma *deoxi* (Cu^+Cu^+). Esta etapa se baseia na observação da formação de o-quinona mesmo na ausência de O_2 . Então, O_2 se liga a forma *deoxi* (Cu^+Cu^+), substituindo o solvente ligado ao Cu(A). Tal forma é, então, atacada pelo segundo equivalente de o-catecol, formando o segundo equivalente de o-quinona. Tal oxidação forma novamente o estado *met*, fechando o ciclo (KOVAL et al., 2006) (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

1.5. Compostos miméticos à enzima catecol oxidase

O uso de moléculas mais simples, de baixo peso molecular, ditos modelos bioinspirados nos sítios ativos de metaloenzimas, tem um importante papel na simulação das principais características espectroscópicas, estruturais e de reatividade na investigação de sistemas bioinorgânicos mais complexos, sendo de extrema importância em casos onde a estrutura e/ou mecanismo dos sistemas em estudo não são disponíveis, ou as informações são ambíguas (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013).

Koval *et al* descreve as diferentes abordagens do estudo mecanístico de enzimas utilizando compostos modelos em 4 grupos:

- O estudo da interação do substrato com o centro metálico, fazendo uso de técnicas cristalográficas e espectroscópicas na caracterização da interação do complexo com o substrato em um ambiente sem O_2 .
- A correlação entre estrutura e atividade, relacionando a atividade do complexo com a distância de ligação entre os metais, o potencial redox e a natureza dos ligantes.
- Estudo cinético de uma reação modelo, observando a influência de vários fatores, como concentração de substrato, oxigênio e pH, propondo mecanismos com base nas taxas de reação observadas.
- Oxidação estequiométrica de catecóis por complexos dicobre peroxi- ou oxo-, que geralmente são propostos como intermediários de reação.

Sistemas modelos de complexos de cobre possuem um papel central na elucidação do mecanismo de reação das enzimas de cobre. A redução do O_2 usando complexos de cobre como modelo vem sendo bastante estudada, e pode-se observar que uma variedade muito grande de intermediários Cu_nO_2 podem ser formados (QUIST et al., 2017).

Tal interesse nestas moléculas também se dá ao fato do alto potencial de simulação da atividade da enzima de interesse, como transporte de oxigênio, transferência de elétrons e catálise de reações. Complexos de cobre se mostram muito efetivos no tratamento de doenças neurodegenerativas e no tratamento de câncer, como tumores no cérebro, glândula mamária e intestino, entre outras doenças (TISHCHENKO et al., 2016).

1.6. Estudo cinético – Modelo de Michaelis-Menten

A velocidade de reação de uma enzima está diretamente ligada a concentração de substrato $[S]$ presente na reação. Porém, estudar o efeito de concentração na velocidade de uma reação é uma tarefa difícil, visto que tal $[S]$ muda durante o curso de reação, sendo convertido em produto. Uma maneira de estudar tal sistema é medindo a velocidade inicial V_0 da reação.

Em um experimento, a $[S]$ é sempre muito maior do que a concentração de enzima $[E]$, a variação inicial de $[S]$ pode ser considerada desprezível e considerada constante. Em pequenas $[S]$, V_0 apresenta um comportamento aproximadamente linear com o aumento de $[S]$, até uma concentração tal onde o aumento de velocidade se torna cada vez menor, até se tornar constante. Neste ponto, é dito que se obteve a velocidade máxima V_{max} da reação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

O perfil cinético das reações enzimáticas e biomiméticas é geralmente estudado pelo esquema de Briggs-Haldane, onde inicialmente ocorre uma etapa rápida de formação de um complexo enzima-substrato, seguido de uma etapa lenta de formação do produto (CARVALHO et al., 2010), conforme esquema mostrado na figura 10. Praticamente todos os estudos de atividade de catecolase com complexos de Cu^{+2} são descritos simplesmente por este modelo, visto poucas exceções (KOVAL et al., 2006).

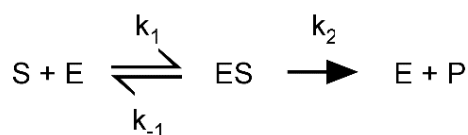


Figura 10 - Esquema de Briggs-Haldane

Em qualquer instante da reação, a enzima pode existir na forma livre E, não ligada ao substrato S, ou na forma ligada ES. Em pequenas concentrações de substrato, a maior parte da enzima se encontrará livre, e a velocidade de reação será proporcional a [S]. A velocidade máxima é atingida quando todas as moléculas livres estejam na forma ligada ES (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). A equação de Michaelis-Menten é mostrada abaixo (**Equação 2**):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

A equação de Michaelis-Menten pode ser rearranjada algebricamente obtendo a partir disto diversas equações lineares. Entre elas está o ajuste linear de Lineweaver-Burk (**Equação 3**) ($1/V_0 \times 1/[S]$) (CARVALHO et al., 2010), entre outros.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

A capacidade de complexos de cobre oxidarem fenóis e catecois é conhecida a mais de 50 anos. Em 1964, Grinstead demonstrou a oxidação do 3,5-DTBC a sua respectiva 3,5-DTBQ. Durante os anos, diversos pesquisadores fizeram uso de complexos bioinspirados na elucidação ou desenvolvimento de reações de oxidação usando tais complexos (KOVAL et al., 2006).

Existem outros métodos para obtenção dos parâmetros cinéticos, métodos estes obtidos a partir da linearização da equação de Michaelis-Menten, como a equação de

Hanes e Eadie-Hofstee. No entanto, o procedimento mais preciso é o ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten, produzido pelo gráfico de $V_0 \times S_0$. O ajuste linear permite uma melhor percepção de pontos que apresentem desvios de comportamento do tipo Michaelis-Menten (CARVALHO et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade de catecolase e estudar a ativação do oxigênio do composto de coordenação [Bis-N-(2-hidroxiethyl)salicilaldiminato]cobre(II).

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a ativação de oxigênio pelo complexo utilizando o método de voltametria cíclica;
- Avaliar o efeito de pH na atividade de catecolase do complexo, usando o substrato modelo 3,5-DTBC e, assim, determinar o pH ótimo para a reação;
- Avaliar o efeito da concentração do substrato na velocidade de reação em seu pH ótimo, e então determinar os parâmetros cinéticos pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten ($V_o \times [S]$);
- Comparar metodologias de cálculo para obtenção dos parâmetros cinéticos, como método de Lineweaver-Burk ($1/V_o \times 1/[S]$).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Síntese do complexo [Bis-N-(2-hidroxietil)salicilaldiminato]cobre(II)

O complexo [[Bis-N-(2-hidroxietil)salicilaldiminato]cobre(II), que será chamado de LCu, foi sintetizado e caracterizado e gentilmente cedido pela aluna Aline Cantuares dos Santos para a confecção deste trabalho (figura 11) (SANTOS, 2017).

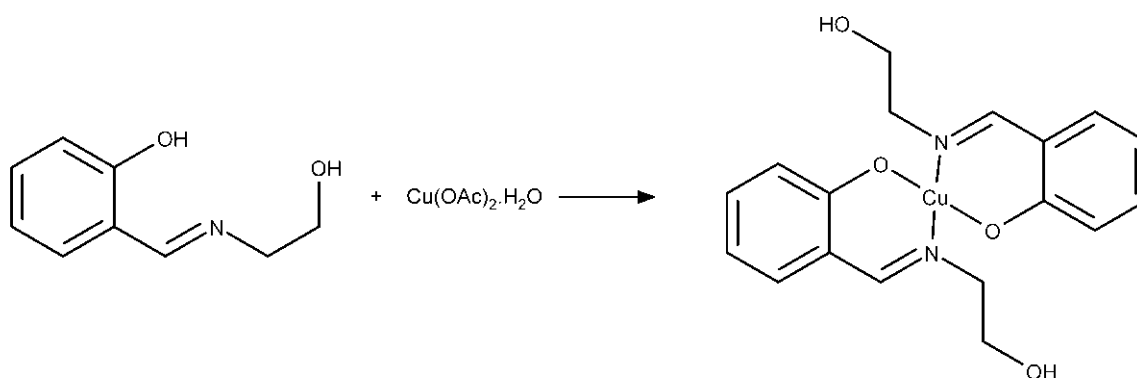


Figura 11 - Representação da síntese do LCu.

3.2. Voltametria cíclica

As análises de voltametria cíclica foram conduzidas em um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT 128N equipado com um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência calomelano e eletrodo auxiliar de platina.

Os voltamogramas foram obtidos sob atmosfera de nitrogênio, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) espectroscópico como solvente e hexafluorofosfato de tetrabutílamônio (TBAPF₆, 0,05 mol L⁻¹) como eletrólito de suporte. As medidas foram conduzidas entre intervalos de -1,5 V a +1,5 V, na velocidade de varredura de 50 mV/s.

3.3. Avaliação da atividade de catecolase

A catalise oxidativa do 3,5-DTBC é estudada como modelo de reação padrão para a atividade de catecolase (figura 12). A quinona correspondente, 3,5-DTBQ, é

considerada um produto estável, e possui uma forte absorção no comprimento de onda em λ_{\max} igual a 400 nm (BEYAZIT et al., 2016).

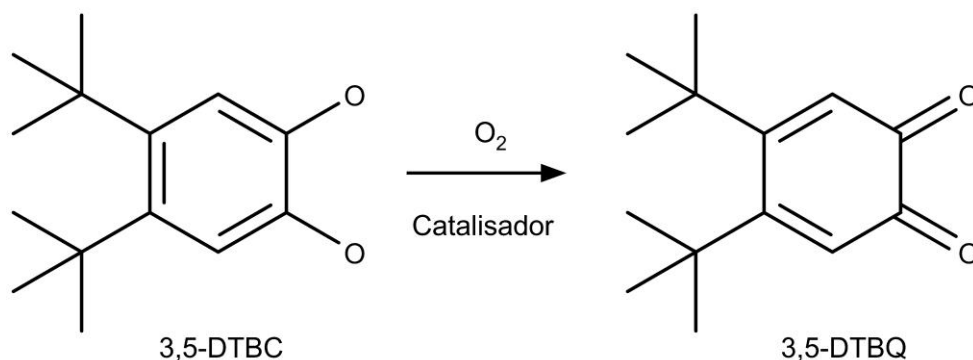


Figura 12 – Esquema da catalise oxidativa do 3,5-DTBC a 3,5-DTBQ

Como procedimento geral, utilizando uma cubeta de 4 ml, de caminho ótico igual a 1 cm, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, foi feito o monitoramento da reação no $\lambda_{\max} = 400$ nm ($\epsilon = 1900$ L mol⁻¹ cm⁻¹) (ALVES, 2011), verificando assim a conversão do 3,5-DTBC a sua quinona correspondente, 3,5-DTBQ. A cubeta onde ocorre a reação foram adicionados solução tampão do pH desejado, o complexo a ser testado, o substrato 3,5-DTBC e MeOH saturado com O₂, formando um volume final de 3,3 ml. As soluções estoque de 3,5-DTBC foram preparadas em MeOH sem O₂ saturado para cada série de análises. As análises foram realizadas no Laboratório de Fotoquímica David Ernest Nicodem do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os gráficos e constantes cinéticas foram obtidos com software OriginPro 2018.

3.3.1. Estudo do efeito de pH

O pH ideal foi determinado variando o pH de 6 à 10, de meia em meia unidade e mantendo as outras concentrações fixas. Os tampões utilizados foram o MES (pH 6,0 – 6,5), HEPES (pH 7,0 – 8,0) e CHES (pH 8,5 – 10). Os experimentos foram realizados em triplicata, em temperatura ambiente, sob condição de excesso de substrato. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. As cubetas de reação foram adicionados, nesta ordem, 100 μ L do complexo ($[C]_{\text{final}} \approx 5,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), 100 μ L de

solução tampão ($[T]_{\text{final}} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), 2700 μL de MeOH saturado com O_2 e 400 μL de substrato ($[S]_{\text{final}} \approx 9,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

3.3.2. Estudo do efeito da concentração de substrato

Os experimentos foram realizados em triplicata, em temperatura ambiente, variando a concentração de substrato. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. O pH ideal determinado anteriormente foi fixado. As cubetas de reação foram adicionados 100 μL do complexo ($[C]_{\text{final}} \approx 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), 100 μL de solução tampão ($[T]_{\text{final}} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), MeOH saturado com O_2 e substrato em diversas concentrações ($[S]_{\text{final}} \approx 5,45 \times 10^{-4} - 7,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), nesta ordem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica utilizada na investigação de processos de oxidação e redução em diferentes compostos e também no estudo de reações onde ocorre transferência de elétrons. (ELGRISHI et al., 2018).

O equilíbrio entre os pares de oxi-redução é dado pela equação de Nernst, que relaciona o potencial da célula (E) ao potencial padrão (E^0) das espécies e a atividade do par de oxi-redução, onde F é a constante de Faraday, n o número de elétrons envolvidos na reação, R a constante universal dos gases e T a temperatura. A equação de Nernst (**Equação 1**) descreve como um sistema responde à mudança na concentração das espécies em solução ou à mudança no potencial do eletrodo (ELGRISHI et al., 2018).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)} \quad (1)$$

Os picos que aparecem no voltamograma estão relacionados às concentrações das diferentes espécies em solução e na superfície do eletrodo, e em como essas espécies se movem entre a superfície do eletrodo e a solução de acordo com o potencial aplicado. Se o processo de redução é reversível, a diferença entre o potencial dos picos catódico e anódico (ΔE_p) é de 57 mV à 25 °C. Quando a transferência de elétrons na superfície do eletrodo é devagar se comparado ao transporte de massa, este processo é irreversível eletroquimicamente. Isto é observado em um voltamograma por um ΔE_p maior que 57 mV. Um processo quimicamente reversível é aquele onde o analito pode ser reduzido e então reoxidado, se mantendo estável (ELGRISHI et al., 2018).

Como forma de estudar qualitativamente a ativação de O_2 pelo complexo LCu, foi realizada a análise por voltametria cíclica do complexo em ausência e presença de oxigênio na solução. Na Figura 13 é possível observar os voltamogramas obtidos.

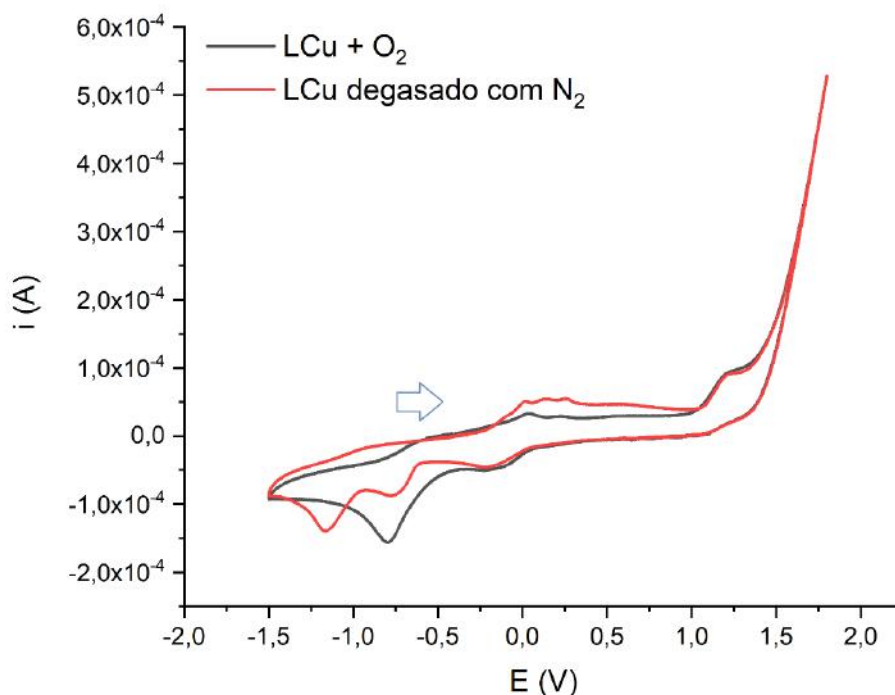


Figura 13 – Voltamogramas Cíclicos obtidos para o complexo CuL em atmosfera de nitrogênio (vermelho), e em atmosfera de O_2 (preto) na faixa de potencial -1,5 V à 1,5 V, em solução de $TBAPF_6$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO com velocidade de varredura: de 100 mV, carbono vítreo:calomelano:platina:

Baseado nos resultados reportados por Santos (2017) as bandas presentes no voltamograma obtido em atmosfera de N_2 , apresentado na Figura 12, podem ser atribuídas como sendo a oxidação do grupo álcool livre na região anódica (+ 1,19 V vs. calomelano). Na varredura inversa, dois picos são observados, possivelmente, referentes aos processos redox $Cu(II)/Cu(I)$ em - 0,78 V vs. calomelano e $Cu(I)/Cu(0)$ em - 1,15 V vs. calomelano (SARGENTELLI et al., 1997).

Já em atmosfera de O_2 o sinal atribuído à oxidação do grupo álcool livre se mantém inalterado. Entretanto, na região catódica observa-se apenas o sinal referente ao processo $Cu(II)/Cu(I)$ em - 0,75 V, com um aumento na corrente. Isto sugere que o complexo pode ser capaz de catalisar a eletroredução de O_2 (SANTOS, 2017).

4.2. Avaliação da atividade de catecolase

4.2.1. Estudo do efeito de pH

A oxidação do 3,5-di-terc-butilcatecol (3,5-DTBC) a sua respectiva 3,5-di-terc-butil-o-benzoquinona (3,5-DTBQ), catalisada pelo complexo LCu foi utilizada como reação modelo para a determinação do pH ótimo de reação. A Figura 14 apresenta o gráfico de velocidade inicial (V_0) x pH obtido para o complexo.

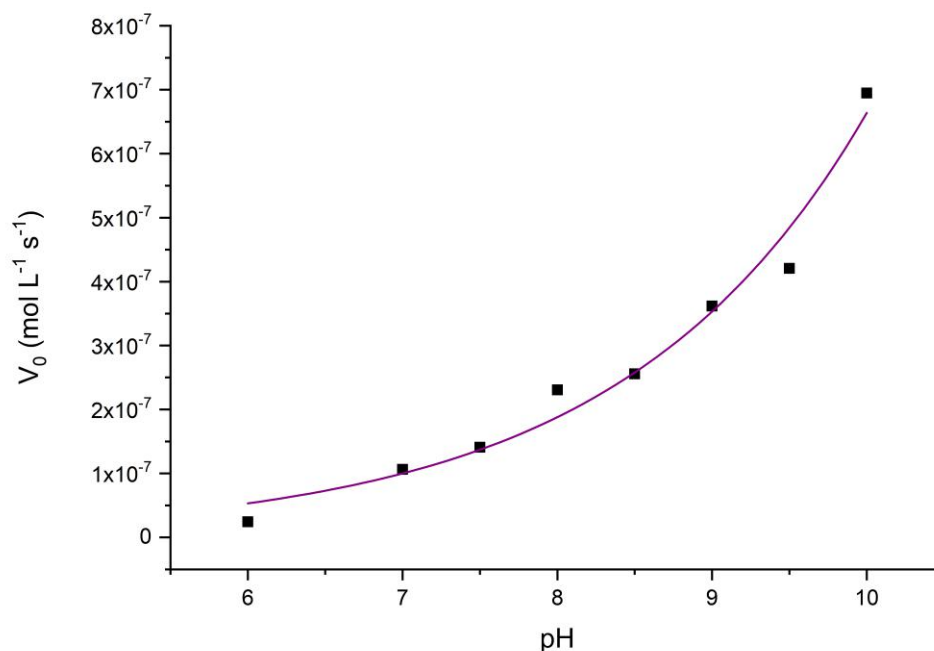


Figura 14 - Dependência da velocidade inicial da reação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo LCu. Condições: $[C]_{\text{final}} \approx 6,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[T]_{\text{final}} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, $[S]_{\text{final}} \approx 1,01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Pode-se observar que em pHs próximos a 6 a atividade é bastante baixa e tem um aumento significativo a partir de 8,5. O perfil da curva não permite determinar a velocidade máxima, uma vez que não foi observado um perfil de saturação nas condições do experimento. Entretanto, os experimentos de variação de concentração do substrato foram medidos em pH 10 para uma direta comparação com outros complexos descritos na literatura.

4.2.2. Estudo do efeito da concentração de substrato

Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo LCu, foi realizada a análise do efeito da concentração do substrato 3,5-DTBC sobre a velocidade da reação modelo. Os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando o modelo de Michaelis-Menten, assim como ajuste linear de Lineweaver-Burk. Na figura 15 é observada a influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação com o ajuste não-linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten.

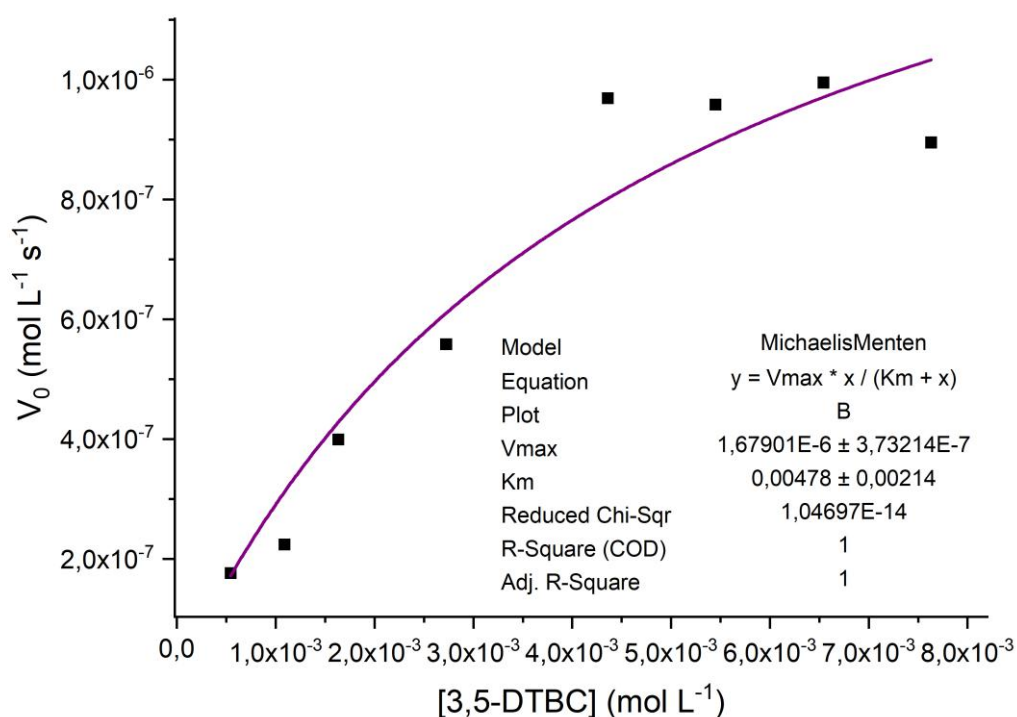


Figura 15 - Dependência da velocidade da reação do 3,5-DTBC com a variação da concentração de substrato para o complexo LCu. Condições: $[C]_{final} \approx 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[T]_{final} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ [CHES, pH 10], $[S]_{final} \approx 5,45 \times 10^{-4} - 7,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Na figura 16 é observada a influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação com o ajuste linear de de Lineweaver-Burk.

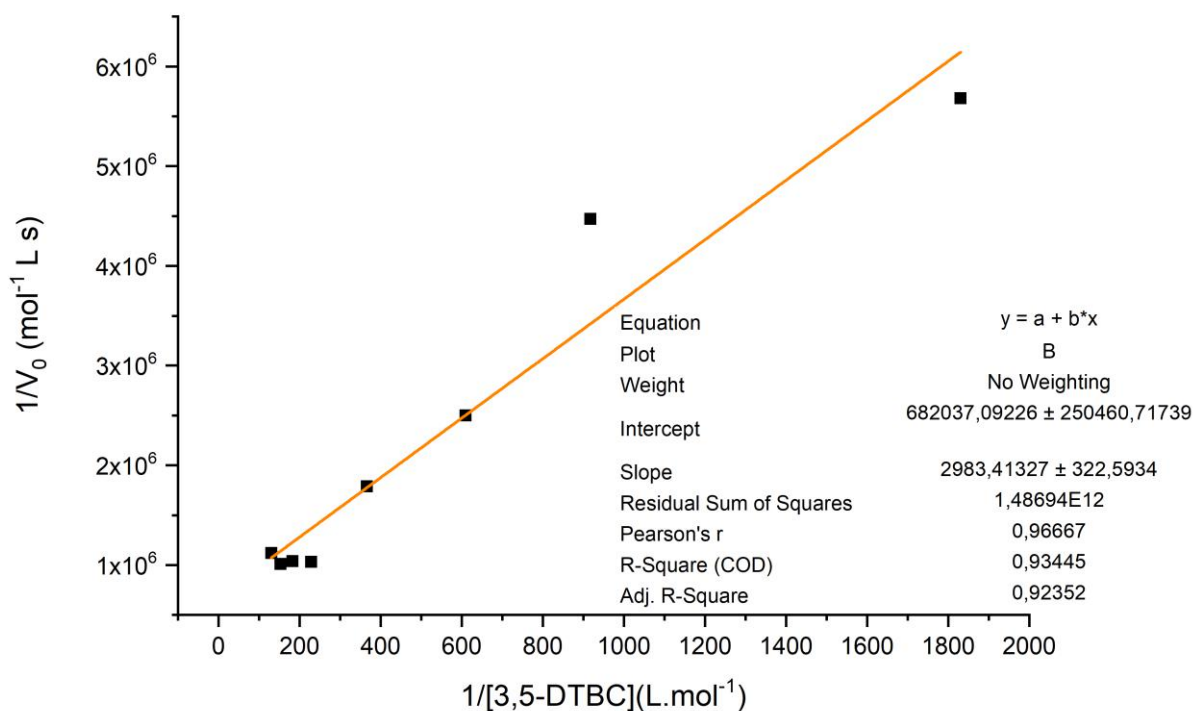


Figura 16 - Dependência da velocidade da reação do 3,5-DTBC com a variação da concentração de substrato para o complexo LCu com ajuste linear de Lineweaver-Burk. Condições: $[C]_{\text{final}} \approx 9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[T]_{\text{final}} \approx 3,03 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ [CHES, pH 10], $[S]_{\text{final}} \approx 5,45 \times 10^{-4} - 7,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten e pelo ajuste linear de Lineweaver-Burk estão condensados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos preliminares obtidos pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten e pelo ajuste linear de Lineweaver-Burk

	Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk
$V_{\text{max}} (\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}) \times 10^{-6}$	$1,68 \pm 0,37$	$1,47 \pm 4,00$
$K_M (\text{mol.L}^{-1}) \times 10^{-3}$	$4,79 \pm 2,15$	$4,37 \pm 1,29$
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1}) \times 10^{-4}$	1,00	0,88
$K_{\text{ass}} (\text{mol}^{-1}.\text{L})$	209	229
$k_{\text{cat}}/K_m (\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}) \times 10^{-2}$	2,1	2

A constante de Michaelis-Menten K_m é uma propriedade de cada enzima ou biomimético. Ela pode ser entendida como um combinado de constantes cinéticas relacionada a formação do complexo ES e em sua subsequente decomposição para a produção do substrato. Em reações com vários substratos, esta constante se relaciona com as várias constantes cinéticas envolvidas (ROSKOSKI, 2014). Tal constante também está relacionada com a estabilidade do complexo ES. Quanto menor este valor, mais estável é o complexo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

A K_{ass} está relacionada a força da ligação do complexo enzima-substrato. Quanto maior este valor, mais favorável é a formação deste complexo. O ciclo catalítico é representado pelo valor de k_{cat} , significando o número de moles de substrato processados por unidade de tempo por mol de enzima, ou número de turnovers. A razão k_{cat}/K_m indica a eficiência catalítica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Na Tabela 5 são mostrados os valores obtidos neste trabalho, comparados a diferentes complexos de Cu^{+2} reportados nos últimos anos. Na figura 17 é mostrada a estrutura dos complexos na tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos da oxidação do 3,5-DTBC catalisado por complexos reportados nos últimos anos

Complexo	V_{max} (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) x 10 ⁻⁶	K_M (mol.L ⁻¹) x 10 ⁻³	k_{cat} (s ⁻¹) x 10 ⁻²	k_{cat}/K_m (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
LCu	1,68 ± 0,37	4,79 ± 2,15	0,01	0,021
1	0,05	2,6	0,006	0,023
2	0,24	5,04	0,47	0,93
3	0,62	3,47	2,5	7,20

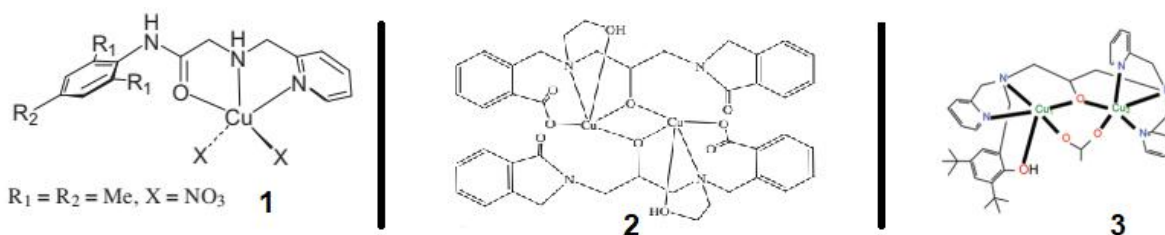


Figura 17 - Estrutura dos complexos na tabela 5. (1) (PANDA et al., 2011) (2) (PATRA et al., 2013) (3) (CASTRO et al., 2016)

O complexo LCu estudado neste trabalho apresentou o menor valor de eficiência catalítica entre os complexos avaliados, apesar dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m obtidos se encontrarem de acordo com valores listados na literatura.

Complexos binucleares de cobre apresentam, em geral, atividade superior a complexos mononucleares. Na literatura, diversos autores atestam até que complexos mononucleares apresentam pouca, se não nenhuma atividade catalítica na oxidação de catecóis (ROCHA et al., 2016). Uma possível explicação para a baixa eficiência pode se dar pelo fato do complexo estudado ser mononuclear e, em seu mecanismo, necessitar formar em solução um dímero com outra molécula do complexo para ser ativo.

Uma outra possível razão para a pequena atividade catalítica apresentada pelo complexo é a reatividade dele com a molécula de O_2 . Os mecanismos propostos para a atividade de catecolase envolvem a geração de um intermediário contendo O_2 . As medidas de voltametria cíclica mostram que o complexo é capaz de catalisar a reação de redução do oxigênio e, portanto, este intermediário não seria facilmente estabilizado.

5. CONCLUSÕES

A partir da análise de voltametria cíclica, pode ser observado qualitativamente a interação do complexo com O_2 . É possível que o complexo catalise a eletroredução do oxigênio. Entretanto, mais estudos devem ser realizados buscando-se identificar esta etapa.

A partir do estudo do efeito do pH na degradação do 3,5-DTBC, foi possível verificar um aumento na atividade catalítica em pHs acima de 8,5. No entanto, não foi observado uma tendência a saturação, não permitindo, assim, observar o pH ótimo para o complexo estudado.

Os parâmetros cinéticos preliminares do complexo foram obtidos a partir de dois tratamentos matemáticos distintos, sendo o ajuste não linear por mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten ($V_0 \times [S]$) e pelo ajuste linear de Lineweaver-Burk ($1/V_0 \times 1/[S]$). Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dois tratamentos matemáticos distintos apresentou valores concordantes.

O complexo estudado possui baixa eficiência catalítica quando comparado a outros complexos estudados na literatura. Estudos mecanísticos podem explicar se essa baixa atividade se deve ao fato do complexo ser mononuclear (e consequentemente, ter que gerar um dímero em solução) ou se o complexo LCu não é capaz de estabilizar a espécie $CuLO_2$.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Buscando estudar o mecanismo presente na oxidação do 3,5DTBC por complexos mononucleares de Cu^{2+} , seria conveniente isolar a espécie gerada na presença de O_2 e avaliar se ela é o ou não um dímero e se possui ou não a ativação por O_2 . A análise por ressonância paramagnética de elétron (RPE) pode ser uma técnica útil nesse estudo.

Além disso, pode-se desenvolver uma série de ligantes semelhantes ao L para que possam ser sintetizados complexos binucleares de Cu^{+2} , com melhores resultados catalíticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, F; MCDOUGALL, C; BEGNAN, B. M. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 1–12, 2013.

ALVES, T. M. R. **Avaliação da Reatividade de Complexos Binucleares de Manganês em Processos Oxidativos**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

BEYAZIT, N. et al. Synthesis, characterization and catecholase-like activity of new Schiff base metal complexes derived from visnagin: Theoretical and experimental study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1119, p. 124–132, 2016.

CARVALHO, N. M. F. et al. Uso de equações lineares na determinação do parâmetros de Michaelis-Menten. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1607–1611, 2010.

CASTRO, K. A. D. F. et al. New copper porphyrins as functional models of catechol oxidase. **Journal of Catalysis**, v. 344, p. 303–312, 2016.

CRICHTON, R. R. **Biological Inorganic Chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function**. 2ª edição ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

CUILLEL, M. The dual personality of ionic copper in biology. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 165–170, 2009.

EICKEN, C.; KREBS, B.; SACCHETTINI, J. C. Catechol oxidase - Structure and activity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 677–683, 1999.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: An essential metal in biology. **Current Biology**, v. 21, n. 21, p. R877–R883, 2011.

GERDEMANN, C.; EICKEN, C.; KREBS, B. The crystal structure of catechol oxidase: New insight into the function of type-3 copper proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 3, p. 183–191, 2002.

HARE, D. J. et al. Imaging metals in biology: balancing sensitivity, selectivity and spatial resolution. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 17, p. 5941–5958, 2015.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**. 2ª edição ed. [s.l.] Willey, 2013.

KOVAL, I. A. et al. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 9, p. 814, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**. 15ª edição ed. [s.l.] W.H. Freeman and Company, 2008.

MIESSLER, G. L.; TARR, D. A. **Inorganic Chemistry**. 3ª edição ed. [s.l.] Pearson, 2004.

ORGEL, L. E. The origin of life-a review of facts and speculations. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 12, p. 491–495, 1998.

OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and Zinc , Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. **Clinical Toxicology**, n. February, p. 18, 2011.

PANDA, M. K. et al. Functional mimics of catechol oxidase by mononuclear copper complexes of sterically demanding [NNO] ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 372, n. 1, p. 145–151, 2011.

PATRA, A. et al. Bis(μ -alkoxo) bridged dinuclear CuII and ZnII complexes of an isoindol functionality based new ligand: Synthesis, structure, spectral characterization, magnetic properties and catechol oxidase activity. **Polyhedron**, v. 67, p. 495–504, 2013.

QUIST, D. A. et al. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 2–3, p. 253–288, 2017.

RENSING, C.; GRASS, G. Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 197–213, 2003.

ROCHA, A. B. et al. Catalytic promiscuity of mononuclear copper(II) complexes in mild conditions: Catechol and cyclohexane oxidations. **Polyhedron**, v. 123, p. 293–304, 2016.

ROSKOSKI, R. Michaelis-Menten Kinetics. In: **Reference Module in Biomedical Research**. [s.l.] Elsevier, 2014.

SANTOS, A. C. DOS. **Síntese e caracterização de compostos de coordenação e seu potencial como miméticos de catalase**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017a.

SANTOS, R. D. DOS. **Síntese, caracterização e atividade eletrocatalítica de compostos de coordenação com ligantes base de schiff para utilização em pilhas à combustível**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017b.

SOLEM, E.; TUCZEK, F.; DECKER, H. Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 8, p. 2884–2888, 2016.

TISHCHENKO, K. I. et al. Copper-containing enzymes: Site types and low-molecular-weight model compounds. **Review Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 49–82, 2016.

WALDRON, K. J. et al. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 823–830, 2009.