

Universidade de Mogi das Cruzes

Vanessa Aparecida Soares

Caracterização do Ciclo Catalítico de Peroxidase de Raiz

Forte Mediado por Agentes Fotorredutores

Mogi das Cruzes, SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de Mogi das Cruzes

Vanessa Aparecida Soares

**Caracterização do Ciclo Catalítico de Peroxidase de Raiz
Forte Mediado por Agentes Fotorredutores**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Mogi das Cruzes para
obtenção do Título de Doutora.**

Orientadora: Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

Mogi das Cruzes, SP

2009

Agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP).

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Soares, Vanessa Aparecida

Caracterização do ciclo catalítico de peroxidase de raiz forte mediado por agentes fotorredutores / Vanessa Aparecida Soares. – 2009.

128 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Iseli Lourenço Nantes

1. Raiz Forte - Peroxidase 2. Azul de metileno 3. Imidas aromáticas 4. Tripletes - espécies 5. RPE 1. Nantes, Iseli Lourenço

CDD 660.634

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

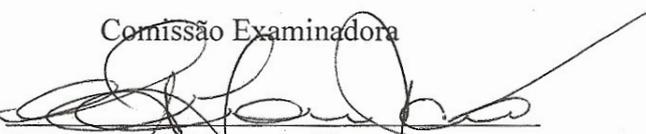
Às nove horas do dia dezessete de fevereiro de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "Caracterização do ciclo catalítico de peroxidase de raiz forte mediado por agentes fotorredutores" para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Vanessa Aparecida Soares**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 74 (setenta e quatro), a saber: 38 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor. A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores Iseli Lourenço Nantes, Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira e Tiago Rodrigues da Universidade de Mogi das Cruzes, Paulo Di Mascio da Universidade de São Paulo e Mauricio da Silva Baptista da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovada por unanimidade
 (aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

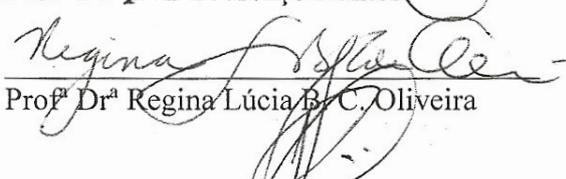
Mogi das Cruzes, 17 de fevereiro de 2009

Comissão Examinadora

Julgamento


 Profª Drª Iseli Lourenço Nantes

(aprovado(a)/reprovado(a))


 Profª Drª Regina Lúcia B. C. Oliveira

(aprovado(a)/reprovado(a))

Dedicatória:

“À minha mãe Océlia, pelo amor, respeito, apoio e admiração em tudo que faço. Sem você eu não teria chegado tão longe!”

“Ao meu querido marido, Daniel, que me apoiou, incentivou e teve muita paciência. Obrigada, pelo seu respeito, compreensão, amizade, carinho e amor.”

AGRADECIMENTOS

A professora Doutora Iseli Lourenço Nantes pela orientação, paciência, amizade, pelos ensinamentos que foram necessários para o desenvolvimento do trabalho e da minha formação profissional.

Aos professores Doutores Otaciro Rangel Nascimento, Adelaide Faljoni-Alário, Maurício S. Baptista, Cláudio S. Shida, Ivarne L. S. Tersariol, Sérgio Brochsztain, e ao aluno de pós-doc Divinomar Severino pelas valiosas colaborações neste trabalho.

Aos professores Doutores Tiago Rodrigues, Cláudio S. Shida e Ivarne L. S. Tersariol pelas interessantes e oportunas observações feitas sobre este trabalho.

Aos colegas e professores do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes pela convivência, ajuda e enriquecimento em minha formação, através de suas experiências.

Aos amigos Rodrigo, Mahyara, e Núbia pela amizade e incentivo.

A Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) por disponibilizar os recursos necessários para minha formação e realização deste trabalho.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

*"A vida passa num instante, mas basta este instante para
empreendermos coisas eternas".*

(E. Bersot)

RESUMO

Peroxidase de raiz forte (HRP) é uma enzima que apresenta a ferro protoporfirina IX como centro catalítico. A reação com peróxidos converte a enzima nos intermediários de alta valência, Compostos I e II, os quais são capazes de oxidar diversas moléculas inorgânicas e orgânicas tais como iodetos, brometos, ascorbato, ferrocianeto, citocromo *c*, aldeídos, fenóis, a forma leuco de muitos corantes e o próprio peróxido. A oxidação dessas moléculas pelos intermediários de alta valência da HRP restaura o estado de oxidação nativo da enzima e completa seu ciclo catalítico. Neste estudo, utilizando espectroscopia de absorção eletrônica e ressonância paramagnética eletrônica, foi caracterizada a capacidade dos agentes fotorredutores: azul de metileno (MB^+) e duas imidas aromáticas, *N,N'*-di(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DPN) e *N*-dodecil-*N'*-(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DMPN) de acelerar o ciclo catalítico da HRP com o conseqüente aumento do consumo de peróxido. Para as imidas aromáticas o efeito das micelas de CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) na redução dos intermediários de alta valência de HRP foi também investigado. As micelas de CTAB aumentam a eficiência catalítica da HRP na presença e na ausência de DMPN. Sobre irradiação, os estados tripletes de MB^+ e DMPN são capazes de abstrair elétrons de moléculas no estado fundamental e/ou da própria enzima e formar o correspondente radical neutro e aniônico, respectivamente. Essas espécies, por sua vez, são capazes de reduzir os intermediários de alta valência da enzima completando seu ciclo catalítico. Similarmente a um cofator enzimático, ambos os agentes fotorredutores são capazes de serem reciclados em sucessivos ciclos redox, porém, MB^+ sofre progressivo *bleaching* devido ao ataque de espécies reativas secundárias. Sistemas fotoenzimáticos como estes são interessantes modelos para estudos do mecanismo catalítico da HRP e podem ter aplicação em nanotecnologia para o desenvolvimento de biossensores, biocatalizadores em tratamento de efluentes, sistemas geradores de radicais livres para efetuar modificações em polímeros alterando suas propriedades e na produção de novas moléculas.

Palavra-chave: Ciclo da HRP. Azul de Metileno. Imidas Aromáticas. Espécies Tripletes. RPE.

ABSTRACT

Horseradish peroxidase (HRP) is an enzyme that exhibits the ferriprotoporphyrin IX as the catalytic center. The reaction with peroxides converts the enzyme to the high valence intermediates Compound I and II that are able to oxidize inorganic and organic molecules such as iodide, bromide, ascorbate, ferrocyanide, cytochrome c, phenols, aldehydes, the leuco form of many dyes and also the peroxides. The oxidation of these molecules by HRP high valence intermediates restore the native oxidation state of the enzyme and completes the catalytic cycle. In this study, by using electronic absorption spectroscopy and electron paramagnetic resonance techniques, it was characterized the capacity of photoreducing agents: methylene blue (MB^+) and two aromatic imides *N,N'*-di(2-phosphonoethyl)-1,4,5,8-naftalenodiimide (DPN) and *N*-dodecil-*N'*-(2-phosphonoethyl)-1,4,5,8-naftalenodiimide (DMPN) to accelerate the rate of HRP catalytic cycle with consequent improvement of the peroxide consumption. For the aromatic imides the effect of CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) micelles on the HRP reduction was also investigated. CTAB micelles improved the catalytic efficiency of HRP towards peroxides in the presence and absence of DMPN. Under irradiation, the triplet states of MB^+ and DMPN are able to abstract electrons from a ground state pair and/or HRP to form the corresponding neutral and anionic radical, respectively. These species, in turn, reduce the high valence states of the enzyme leading the cycle to the completion. Similarly to an enzyme cofactor, both the photoreducing agents are able to be recycled in successive redox cycles but MB^+ suffer progressive bleaching due to the attack of reactive secondary species. These photochemical systems are interesting models for the study of HRP catalytic mechanisms and could be applied in nanotechnology to develop biosensors, biocatalysts for effluents, free radical systems to modify polymers and to produce new molecules.

Key-Words: HRP cycle. Methylene blue. Aromatic Imides. Triplet species. EPR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação do grupo Heme	17
Figura 2.	HRP.	23
Figura 3.	Espectro óptico de HRP nativa, HRP Composto I e HRP Composto II.	25
Figura 4.	Espectro de absorção das formas monômero e dímero (linha pontilhada) de 30 μM de MB^+	26
Figura 5.	Espectro transiente das espécies fotoexcitadas do corante.	27
Figura 6.	Espectro de absorção da imida NDI em água.	30
Figura 7.	Espectro UV-visível de HRP e azul de metileno no curso da reação com peróxido de hidrogênio.	50
Figura 8.	Perfil da velocidade de regeneração de HRP nativa a partir de HRP Composto II em função do pH e perfil da reatividade do MB^+ triplete em função do pH.	51
Figura 9.	Efeito da concentração de MB^+ e oxigênio molecular na velocidade de decaimento de HRP Composto II à forma nativa.	54
Figura 10.	Espectro transiente normalizado ΔA de <i>Flash</i> fotólise de MB^+ livre e associado à HRP e o efeito da HRP no tempo de vida do MB^+	57
Figura 11.	Espectro de EPR.	60
Figura 12.	Figura mostrando os possíveis sítios de ligação do corante na estrutura da HRP.	62
Figura 13.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo de micelas de CTAB.	66
Figura 14.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo.	67
Figura 15.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo, na presença da imida DMPN.	68
Figura 16.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo, na presença da imida DMPN.	69

Figura 17.	Efeito da concentração de DMPN na redução dos intermediários de alta valência no ciclo catalítico da HRP.....	71
Figura 18.	Curva de formação de HRP nativa a partir de HRP Composto II em função da concentração de imidas. .	73
Figura 19.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo, na presença da imida DPN.....	74
Figura 20.	Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo, na presença da imida DPN.....	75
Figura 21.	Efeito da concentração de DPN na redução dos intermediários de alta valência no ciclo catalítico da HRP.....	76
Figura 22.	Espectro de absorção no tempo inicial (linha preta) e final (linha azul) da oxidação do guaiacol pela HRP Composto II.....	78
Figura 23.	$\Delta \lambda_{\text{máx}}$ do Trp da HRP na presença de diferentes concentrações de CTAB.....	80
Figura 24.	Espectro de CD <i>near</i> -UV da HRP na ausência de CTAB, na presença de 20 e 60 mM de CTAB, de acordo com a seta.....	81
Figura 25.	Espectro de fluorescência da imida DPN na presença de CTAB.....	82
Figura 26.	Razão entre as bandas de fluorescência obtida em função da concentração de DPN em presença de CTAB.....	83
Figura 27.	Efeito do CTAB na fluorescência máxima da imida DPN ($\lambda = 383$ nm).....	84
Figura 28.	Espectro de fluorescência do triptofano da HRP na presença imida DMPN.....	85
Figura 29.	Variação do λ máximo do espectro de fluorescência do triptofano da HRP em função da concentração da imida anfifílica, DMPN.....	85
Figura 30.	Espectro de formação do ânion radical de DMPN gerado quimicamente.....	87

Figura 31.	Espectro de formação de HRP – Fe ²⁺ , após a formação do ânion radical de DMPN gerado quimicamente.	88
Figura 32.	Espectro de regeneração de HRP nativa a partir de HRP – Fe ²⁺ e decaimento do ânion radical de DMPN gerado quimicamente.	88
Figura 33.	Espectro do decaimento do ânion radical gerado quimicamente na presença de HRP Composto II. ...	89
Figura 34.	Espectros de EPR na ausência de imida obtidos a 11 K.	91
Figura 35.	Espectros de EPR na presença da imida DMPN obtidos a 11 K.	93
Figura 36.	Espectros de EPR na presença da imida DPN obtidos a 11 K.	93
Figura 37.	Espectros de EPR CW obtidos a 11 K.	95
Figura 38.	Espectros de EPR pulsado obtidos a 4 K.	95
Figura 39.	Medidas de HRP nativa, obtidas a 4 K.	97
Figura 40.	Medidas de amplitude de HRP nativa, obtidas a 4 K.	97
Figura 41.	Medidas de HRP com H ₂ O ₂ , obtidas a 4 K.	98
Figura 42.	Medidas de amplitude de HRP com H ₂ O ₂ , obtidas a 4 K.	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Ciclo catalítico das peroxidases.	20
Esquema 2.	Mecanismo “ <i>ping-pong</i> ”.	21
Esquema 3.	Ciclo das Peroxidases representado na forma de mecanismo “ <i>ping-pong</i> ”.	22
Esquema 4.	Estrutura molecular do Azul de Metileno.	26
Esquema 5.	Redução de citocromo <i>c</i> por MB [•]	27
Esquema 6.	Estrutura molecular das NDI.	29
Esquema 7.	Formação de um agregado micelar.	31
Esquema 8.	Representação esquemática de uma micela aquosa.	33
Esquema 9.	Modelo de interação entre a HRP e o corante.	55
Esquema 10.	Ciclo catalítico da HRP utilizando HOOH como agente oxidante e redutor.	63
Esquema 11.	Ciclo catalítico da HRP utilizando HOOH como agente oxidante e MB [•] como agente redutor.	63

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLA

GSH	Glutathiona
LiP	Lignina Peroxidase
HRP	Horseradish Peroxidase
HOOH	Peróxido de Hidrogênio
Hist	Histidina
Asp	Asparagina
Ser	Serina
Val	Valina
Gly	Glicina
Thr	Treonina
Ile	Isoleucina
Arg	Arginina
Phe	Fenilalanina
Asn	Asparagina
Pro	Prolina
IAA	Ácido Endo-Acético
MB ⁺	Azul de Metileno no estado fundamental
MB [·]	Radical neutro de Azul de Metileno
MB ²⁺	Cátion radical de Azul de Metileno
cyt c	Citocromo c
NDI	Naftalenodiimidaz
DBN	N,N'-dibutil-1,4,5,8-naftalenodiimida
DPN	N,N'-di(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida
DMPN	N-dodecil-N'-(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida
ϵ	Coeficiente de absorção molar
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
UV	Ultravioleta
vis	Visível
λ	Comprimento de Onda
K_{obs}	Constante de velocidade
K_{MB}	Constante de pseudoequilíbrio
E_{ox}	Enzima oxidada
E_{red}	Enzima reduzida
$Na_2S_2O_4$	Ditionito de Sódio
RPE	Ressonância paramagnética
CW	Onda Contínua
g	Fator giromagnético
A	Amplitude

SUMÁRIO

1. Introdução.	15
1.1. Peroxidases.	16
1.2. Peroxidase de Raiz Forte.	22
1.3. Azul de Metileno.	25
1.4. 1, 4, 4, 8, - naftalenodiimida (NDI).	28
1.5. Surfactantes e Micelas.	30
1.6. Justificativa.	34
2. Objetivos.	36
3. Método.	38
3.1. Reagentes.	38
3.2. Preparo de Soluções.	38
3.3. Sistema de Irradiação.	42
3.4. Cinética Enzimática.	43
3.5. Simulação Computacional.	44
3.6. Técnicas Analíticas Utilizadas.	45
4. Resultados e Discussões.	48
4.1. Parte 1 – Caracterização do Ciclo Catalítico da HRP Utilizando-se Azul de Metileno Fotoativado Como Agente Redutor.	48
4.1.1. Estudo Espectral.	48
4.1.2. Efeito do pH sobre a Redução de HRP Composto II na Presença e na Ausência de MB ⁺ Fotoativado.	51
4.1.3. Efeito da Concentração de MB ⁺ , na Ausência e na Presença de Oxigênio, sobre a Velocidade de Redução de HRP Composto II.	52
4.1.4. Caracterização das espécies transientes do MB ⁺ fotoativado.	55

4.1.5. Caracterização do ferro hemínico e do intermediário oxiferril porfirina π -cátion na presença de MB ⁺	58
4.1.6. Modelo proposto para associação entre MB ⁺ e HRP.....	61
4.1.7. Mecanismo de Reação.....	62
4.2. Parte 2 – Caracterização do Ciclo Catalítico da HRP Utilizando-se as Imidas, DMPN e DPN, Fotoativadas Como Agentes Redutores, na Presença e na Ausência de Micelas de CTAB.....	65
4.2.1. Estudo Espectral e Cinético.....	65
4.2.2. Estudo Estrutural.....	79
4.2.3. Processo de Transferência de Elétrons entre a Imida e a Enzima.....	86
4.2.4. Caracterização do ferro hemínico e do intermediário oxiferril porfirina π -cátion na presença das imidas.....	90
4.3. Parte 3 – Estudo do Intermediário Formado no Ciclo Catalítico da HRP pela Técnica de EPR Pulsado.....	94
5. Conclusões e Sugestões.....	100
6. Referências.....	102
Apêndice.....	111

1. Introdução

A necessidade de aprimorar o desenvolvimento de novos produtos e processos, de racionalizar as formas de utilização de energia e de desenvolver métodos de obtenção de produtos com impacto menos agressivo ao meio ambiente, têm levado a inovações tecnológicas (ZAMARAEV, 1997). Estudo de sistemas fotoenzimáticos, como o apresentado no presente trabalho, pode contribuir como uma importante ferramenta para a nanobiotecnologia, mais precisamente para o desenvolvimento de biossensores e para a degradação de peróxido de hidrogênio.

O desenvolvimento de biossensores iniciou-se há cerca de duas décadas e atualmente encontra-se em plena etapa de expansão, com investimentos milionários no setor. Um biossensor é um dispositivo no qual se incorpora uma substância (ex: uma enzima, um anticorpo, uma proteína, DNA, etc) para poder medir de modo seletivo, determinada substância. Um exemplo seria a medida da quantidade de chumbo ou de bactérias na água, ou a quantidade de toxinas presentes nos alimentos. Este dispositivo é capaz de interpretar as mudanças químicas produzidas em presença do composto biológico, originando um sinal eletrônico capaz de ser interpretado em poucos minutos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento *on line* de efluentes (e outras matrizes de interesse), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos. Biossensores, e no caso específico, sensores de peróxido de hidrogênio, podem ser utilizados em indústrias farmacêuticas e alimentícias em que o peróxido é um possível efluente industrial. Os biossensores representam uma ferramenta promissora para complementar as técnicas existentes, devido suas

características únicas, tais como: seletividade, baixo custo relativo de construção de equipamentos simples e portáteis para uma rápida análise de monitoramento no campo *on site*. Entretanto, é necessário enfatizar que os principais problemas no desenvolvimento de biossensores são a estabilidade da biomolécula e o tempo de resposta. Dessa forma, neste trabalho caracterizamos mediadores que podem reduzir o tempo de resposta e corroborar para a estabilidade da enzima (LEITE *et al.*, 2003; HALLDORSON *et al.*, 2003).

1.1. Peroxidases

O nome peroxidase refere-se a uma importante classe de enzimas cuja especificidade é clivar peróxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio (GASPAR *et al.*, 1982). As peroxidases são enzimas que têm em comum a presença do grupo prostético heme (DUNFORD, 1999), a ferro Protoporfirina IX (Fig. 1), como centro catalítico (NELSON e COX, 2000), sendo que a natureza do ligante axial e alguns detalhes do mecanismo de reação são bastante diferentes (LIPPARD e BERG, 1994).

Duas formas cataliticamente ativas das peroxidases são intermediárias de alta valência Composto I (Porfirina π cátion $Fe^{4+}=O$) e Composto II (Porfirina $Fe^{4+}=O$) produzidas pela clivagem de peróxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio (DUNFORD, 1999).

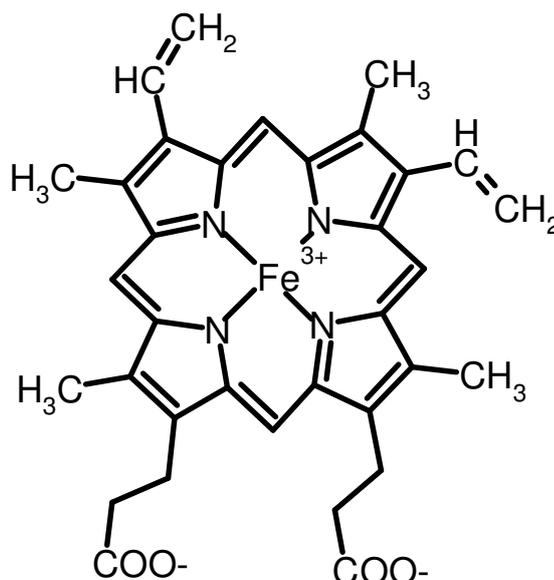


Figura 1. Representação do grupo Heme.

As peroxidases estão presentes em todos os animais e plantas e devido à capacidade de clivar peróxido de hidrogênio exibem importante função antioxidante, pois o peróxido de hidrogênio ao reagir com metais como o ferro e o cobre (reação de Fenton) produz o radical hidroxil, uma espécie altamente reativa e, portanto, deletéria para a célula. Por ação de peroxidases como a catalase e a glutathione-peroxidase, esta última que utiliza a glutathione (GSH) como agente redutor, o peróxido de hidrogênio é degradado em água e em oxigênio molecular (RAHMAN e BISWAS, 2006).

Nas plantas, as peroxidases além de catalisarem a clivagem do peróxido de hidrogênio, participam também da biossíntese de lignina, (GRISEBACH, 1981; STRACK, 1997) incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina à parede celular (TENHAKEN *et al.*, 1995), destruição peroxidativa do ácido indolacético e de outros reguladores de crescimento (BARZ *et al.*, 1981).

As diversas reações catalisadas por peroxidases ocorrem em diferentes locais da célula e acredita-se que a localização destas enzimas depende das reações que catalisam.

Existem 3 classes de peroxidases (HINER *et al.*, 2002):

- Classe I são enzimas intracelulares, incluindo citocromo *c* e ascorbato peroxidase de plantas.
- Classe II inclui a peroxidase de secreção de fungo como a lignina peroxidase (LiP) que possui como principal função degradar a lignina.
- Classe III inclui peroxidases secretadas por plantas, como a HRP; essas peroxidases são enzimas biossintéticas envolvidas no processo de formação da parede celular e lignificação.

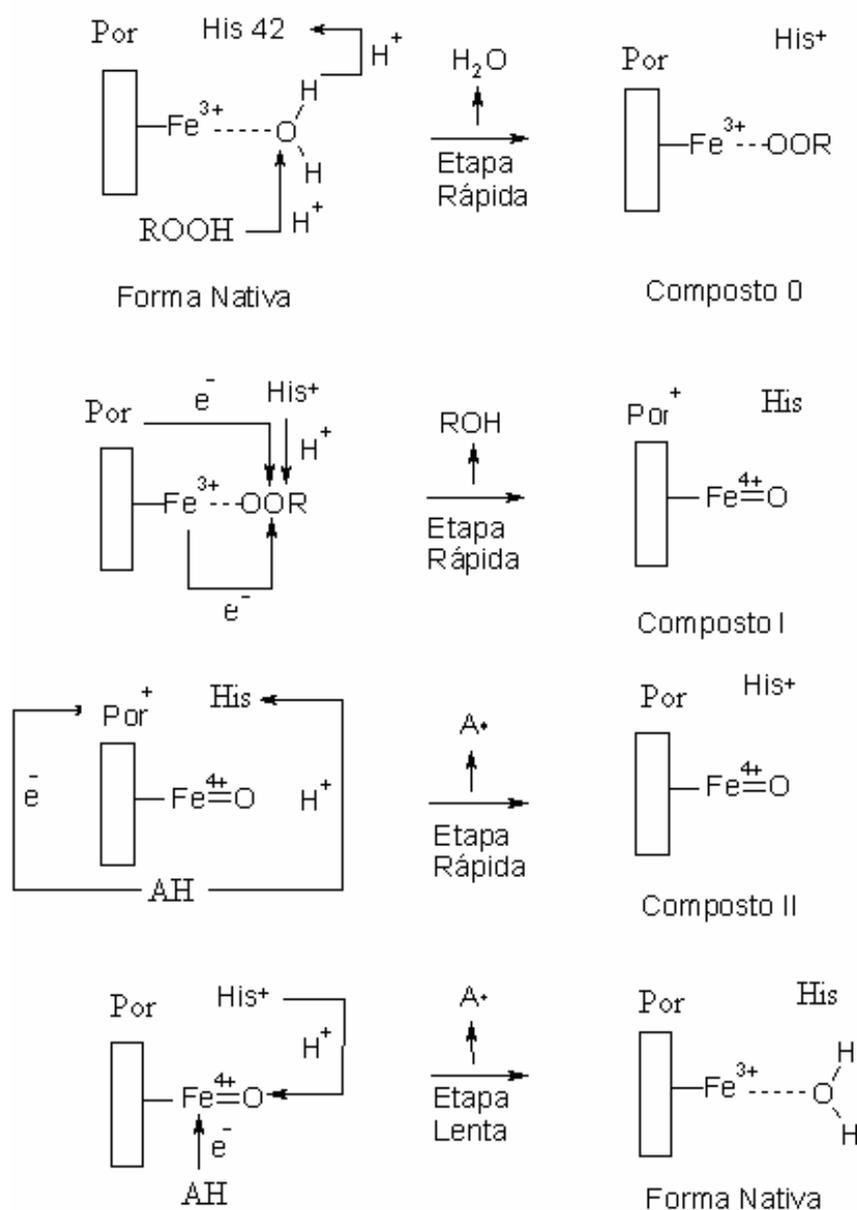
Em diversas plantas tem sido descrito o aumento dos níveis de peroxidases durante situações de estresse. As peroxidases fazem parte da primeira linha de defesa da planta e aumentam sua atividade em diversas situações de estresse para a planta como exposição ao ozônio (CASTILHO e GREPPIN, 1986), poluição (HEATH, 1980; CASTILHO e GREPPIN, 1987), radiação (FRYLINCK *et al.*, 1987), desordens nutricionais (LEIDI *et al.*, 1987), ferimentos (LAGRIMINI e ROTHSTEIN, 1987; ESPELIE, *et al.*, 1988), infecções (FRYLINCK *et al.*, 1987), salinidade (CHANG *et al.*, 1981) e envelhecimento (HAZELL e MURRAY, 1982).

As peroxidases são consideradas também como uma das principais enzimas responsáveis pelo catabolismo do fitohormônio IAA nas plantas superiores, sugerindo sua importância na regulação do crescimento das plantas (EVERSE e GRISHAM, 2000).

As peroxidases já estudadas possuem como base um mesmo ciclo catalítico que consiste de três etapas distintas e irreversíveis, chamado de ciclo das peroxidases (DUNFORD, 1992).

A enzima no estado férrico liga-se de forma reversível a um peróxido ROOH, forma o complexo conhecido como Composto 0 (PorFe(III)-OOR) (BAEK *et al.*, 1989), o qual cliva o peróxido em um processo que envolve transferência de dois elétrons e gera o intermediário conhecido como Composto I (Por⁺ • Fe(IV)=O). O Composto I pode abstrair um único elétron oxidando uma segunda molécula de peróxido ou qualquer outro agente redutor para formar o Composto II (PorFe(IV)=O) (CASTILHO e GREPPIN 1986). Quando o peróxido utilizado é o peróxido de hidrogênio (HOOH), a reação do Composto II com mais HOOH forma Composto III, um complexo entre peroxidase férrica e íon superóxido, conhecido como oxiperoxidase (PorFe(III)O₂⁻ • ↔ PorFe(II)O₂). O Composto II também pode receber um elétron e voltar a sua forma nativa (PorFe(III)), completando o chamado ciclo das peroxidases.

Trabalhos da literatura têm mostrado que os prótons, na região distal do sítio ativo do grupo heme, influenciam a formação das espécies catalíticas reativas, tanto nas peroxidases como no citocromo P450 (SAVENKOVA *et al.*, 1988). Em HRP, a Hist42 age como um catalisador ácido/base que favorece o desprotonamento do hidroperóxido no sítio ativo da enzima (Composto 0) e sua subsequente clivagem heterolítica (SAVENKOVA *et al.*, 1988; SMITH e VEITCH, 1988). Portanto, o desprotonamento do hidroperóxido é uma etapa crucial no ciclo catalítico das peroxidases e do citocromo P450. O esquema a seguir mostra o ciclo catalítico das peroxidases e o papel da histidina no processo.

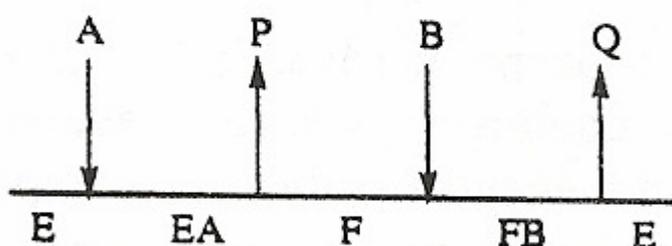


Esquema 1. Ciclo catalítico das peroxidases. A enzima em sua forma nativa liga-se a um peróxido, e forma o Composto 0, o qual cliva o peróxido em um processo que envolve a transferência de dois elétrons e gera o Composto I. Este abstrai um elétron oxidando um agente redutor para formar Composto II. Na presença de um agente redutor o Composto II recebe um elétron e volta a sua forma nativa, completando o ciclo das peroxidases.

A cinética enzimática das peroxidases difere da cinética enzimática clássica, uma vez que esta considera os fundamentos de reações reversíveis entre o complexo, enzima-substrato, e o conceito de estado estacionário, apresentados por MICHAELIS e MENTEN, 1913, e BRIGGS e HALDANE, 1925, respectivamente.

Esses conceitos causam confusão no ciclo catalítico das peroxidases devido à ocorrência de reação irreversível e a dificuldade de detectar o complexo enzima-substrato.

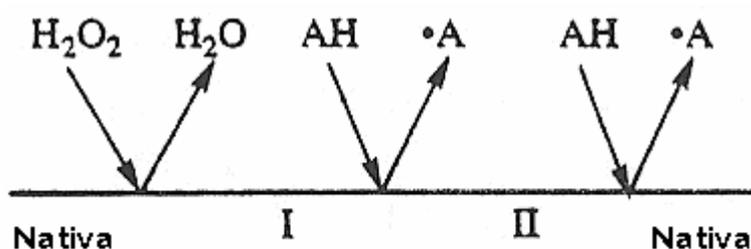
O comportamento da catálise enzimática envolvendo dois diferentes substratos não era bem entendido até 1953, quando ROBERT ALBERTY, 1953, estabeleceu o seguinte mecanismo: um substrato se liga, seguido pelo surgimento do primeiro produto. Uma enzima modificada é o resultado, na qual o segundo substrato se liga, seguido pelo surgimento de segundo produto. Este mecanismo ficou conhecido como “*ping-pong*” por CLELAND, 1990, e está representado no esquema 2. O mecanismo “*ping-pong*” convencional é reversível. Uma consequência da reversibilidade é que há um limite superior finito na velocidade da reação. A cinética de peroxidases é similar à cinética “*ping-pong*”, com exceção da irreversibilidade, o que implica em não haver limite superior na velocidade da reação.



Esquema 2. Mecanismo “*ping-pong*”. Caminho da reação: o substrato A reage com a enzima E modificando-se à forma F. A enzima modificada (F) reage com o segundo substrato (B) formando Q e libera a enzima em sua forma nativa (E) (DUNFORD, 1999).

As reações do ciclo catalítico das peroxidases podem ser representadas como um mecanismo “*ping-pong*” irreversível (esquema 3). Para que a reação aconteça, a enzima e o substrato devem colidir e formar um complexo, no caso de

reações irreversíveis, a velocidade de reação neste complexo é muito rápida, quando comparada às reações reversíveis. Dessa maneira, o equilíbrio entre reagentes e produtos não pode ser estabelecido.



Esquema 3. Ciclo das Peroxidases representado na forma de mecanismo “ping-pong”. Como o complexo enzima-substrato possui um tempo de vida muito curto, não é possível detectá-lo, o que se observa é a formação do produto. No esquema, Nativa refere-se à peroxidase em seu estado nativo, I é o Composto I e II é o Composto II (DUNFORD, 1999).

1.2. Peroxidase de Raiz Forte

A Peroxidase de Raiz Forte, HRP, mostrada na Figura 2, é uma hemoproteína extraída da *Amaracia rusticana*, uma raiz de plantas cultivadas em regiões temperadas com grande valor na culinária como molho ou tempero. A produção de HRP ocorre relativamente em larga escala por causa de sua vasta gama de aplicações comerciais. Destacam-se a biodegradação de efluentes na indústria de papel e celulose e compostos fenólicos (ORTIZ DE MONTELLANO, 1992; VEITCH e SMITH, 2001; DUNFORD, 1999; MAEDA *et al.*, 2002; KRIEG e HALBHUBER, 2003), oxidação de toxinas devido ao peróxido (FOLKS e WARDMAN, 2004; FOLKS *et al.*, 2006) e biossensores de peróxidos de hidrogênio (LI *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008), entre outras aplicações clínicas e biomédicas (DESHPANDE, 1996; KASAI *et al.*, 2002). A massa molecular da HRP é 44000 Da, incluindo a cadeia polipeptídica (33890 Da), um grupo heme oxidado, mais Ca^{+2} (aproximadamente 700 Da), e uma cadeia polissacarídica (9400 Da). A HRP apresenta as seguintes

características: histidina 170 como quinto ligante do ferro hemínico; dois íons cálcio (distal e proximal) respectivamente heptacoordenados com Asp43, Asp50, Ser52, Val46, Gly48, H₂O e Thr171, Asp222, Thr225, Asp230, Ile228 e sítios de glicosilação nos resíduos de asparagina 13, 57, 158, 186, 198, 214, 255 e 268 que ocupam regiões de *loop* da estrutura protéica. No processo catalítico destacam-se os seguintes resíduos de aminoácidos:

Arg38 – essencial na formação e estabilização do Composto I;

Phe41 – possibilita o acesso do substrato ao oxigênio ferril do Composto I;

His42 – essencial na formação do composto I e na estabilização de substratos aromáticos;

Asn70 – mantém o caráter básico da His42;

Pro139 – participa da estrutura 'Pro X Pro' (Pro139, Ala140, Pro141, na HRPC), a qual é conservada em peroxidases de plantas (VEITCH, 2004).

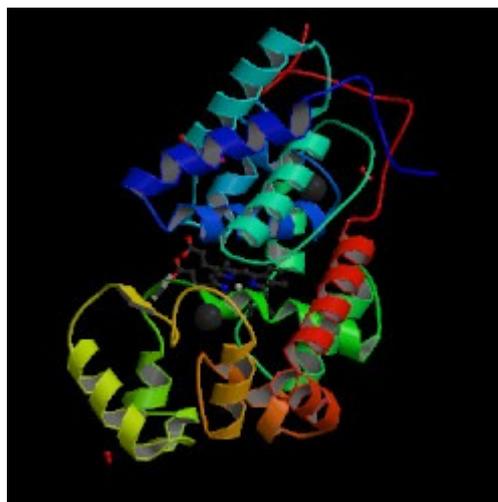


Figura 2. HRP. À esquerda raiz forte. À direita representação estrutural em três dimensões da peroxidase de raiz forte (HRP) (VEITCH e SMITH, 2001).

O espectro óptico de HRP nativa, HRP Composto I e HRP Composto II está representado na Figura 3. O grupo heme é um forte cromóforo (DUNFORD e BRIAN, 2005), dessa forma, a enzima em seu estado nativo apresenta o máximo de absorvância (banda Soret) em 403 nm e um “ombro” em 380 nm (característico da quinta coordenação do Fe (III)). Quando a HRP nativa é convertida em HRP Composto I, a absorvância do pico da banda Soret em 403 nm diminui aproximadamente pela metade (detectado por *stop flow*). A formação de HRP Composto II é acompanhada por um deslocamento batocrômico, ou seja, a banda Soret é deslocada de 403 nm (HRP nativa e HRP Composto I) para 420 nm. Segundo DUNFORD, 2005, quando menos de 100% da enzima é convertida à HRP Composto II, a banda Soret em 420 nm apresenta menor intensidade de absorção que a enzima em sua forma nativa. Outra característica da formação de HRP Composto II são os picos de absorção em 527 e 554 nm. Esta forma da enzima é mais estável que HRP Composto I e mais fácil de caracterizar (RAKHIT *et al.*, 1976).

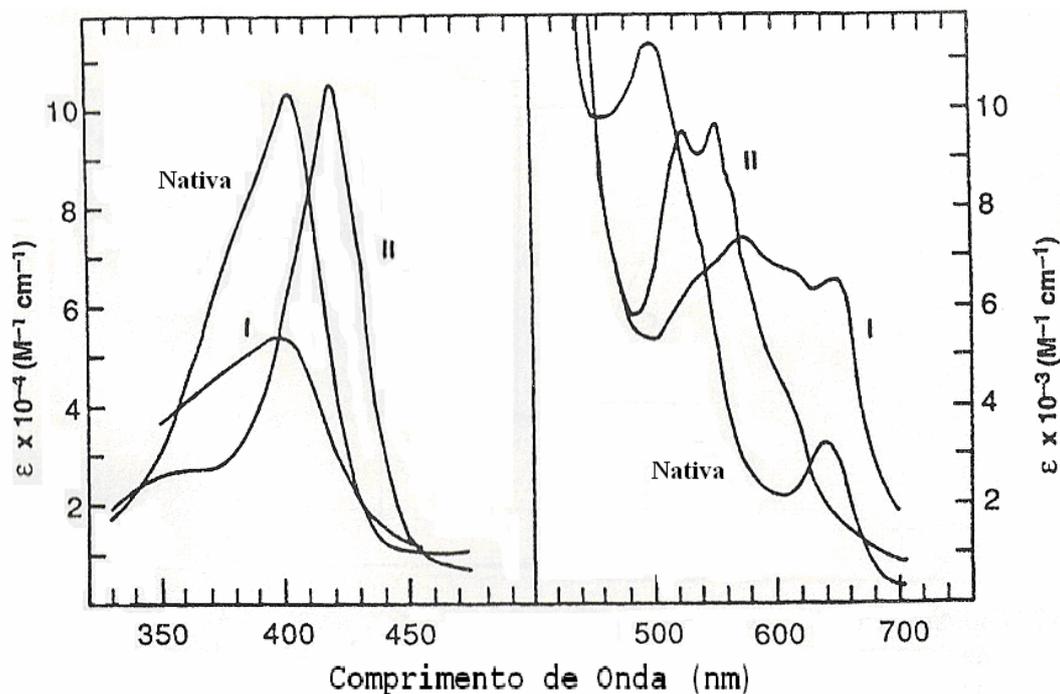


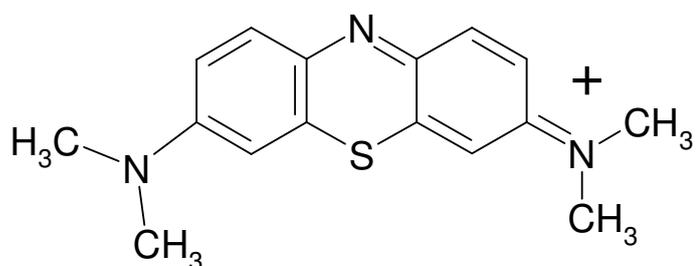
Figura 3. Espectro óptico de HRP nativa, HRP Composto I e HRP Composto II (DUNFORD, 1999).

Embora a HRP venha sendo empregada em biossensores (LI *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008), estudos básicos sobre o tempo de seu ciclo catalítico, são ainda raros na literatura. Assim, o estudo realizado neste trabalho foi importante para compreender o ciclo catalítico dessa enzima na presença de moduladores fotoquímicos.

1.3. Azul de Metileno

O azul de metileno (esquema 4) é um corante fotosensibilizador que possui interessantes características fotoquímicas. Apresenta alto rendimento quântico de cruzamento intersistema, exibindo assim, a espécie triplete com um longo tempo de vida intrínseco e, conseqüentemente, apresenta baixo rendimento quântico de fluorescência. O estado triplete de MB^+ possui a capacidade de fotosensibilizar oxigênio molecular por transferência de energia e gerar oxigênio singleto (MUROV *et al.*, 1993; SEVERINO *et al.*, 2003). Por causa dessas características, este corante

tem sido usado em uma variedade de aplicações fotoquímicas, tais como, conversão de energia solar (CHAN e BOLTON, 1980; MISRAN *et al.*, 1994) e terapia fotodinâmica (WAINWRIGHT *et al.*, 1997; MIELLISH *et al.*, 2002).



Esquema 4. Estrutura molecular do Azul de Metileno.

O azul de metileno é também conhecido por formar agregados que podem ser caracterizados espectroscopicamente. A Figura 4 representa o espectro de absorção das formas monômero e dímero do corante (OHLIN *et al.*, 2001; JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

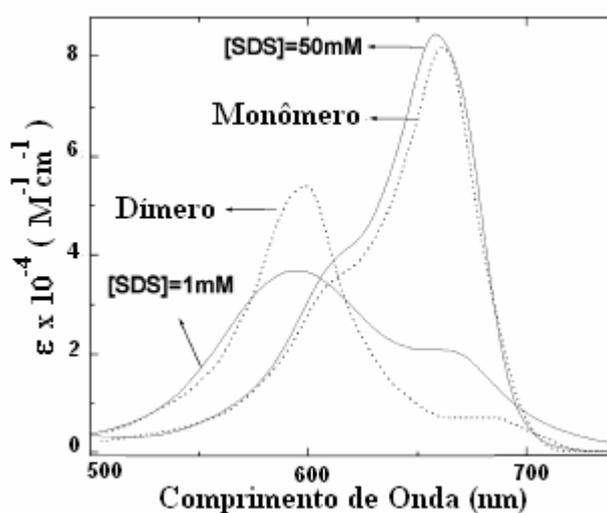


Figura 4. Espectro de absorção das formas monômero e dímero (linha pontilhada) de 30 μM de MB^+ (JUNQUEIRA, *et al.*, 2002).

Na forma agregada o estado triplete do MB^+ é capaz de remover elétrons de outra molécula do corante no estado fundamental e gerar o par: radical neutro (MB^\bullet) / cátion radical ($MB^{2+\bullet}$). Os espectros transientes, obtidos por meio de flash fotólise, do corante na forma triplete, radical neutro e cátion radical estão representados na Figura 5.

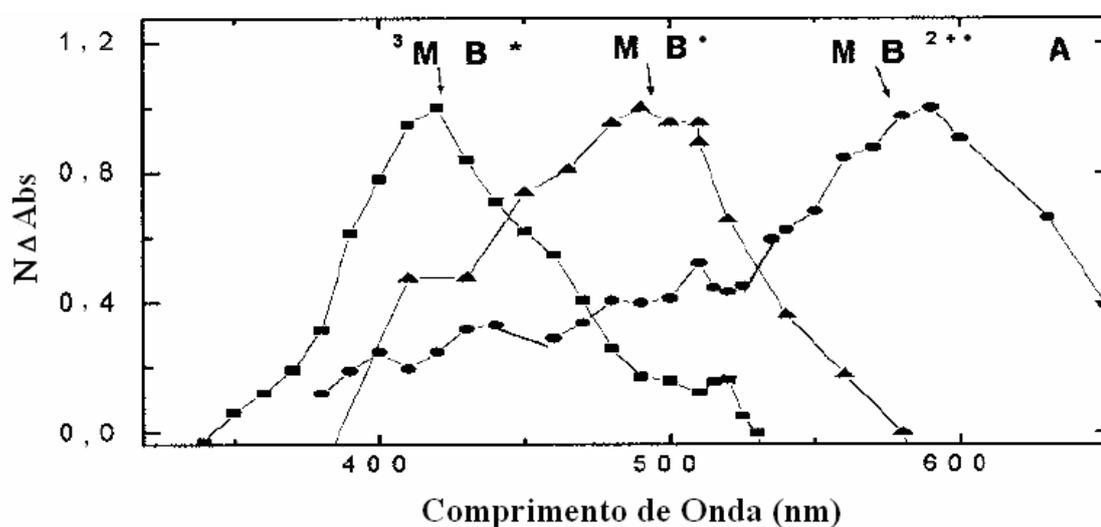
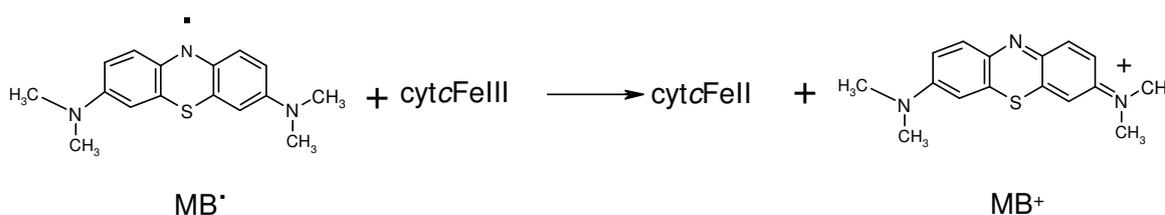


Figura 5. Espectro transiente das espécies fotoexcitadas do corante. $^3MB^+$, MB^\bullet , $MB^{2+\bullet}$, representam MB triplete, radical neutro e cátion radical, respectivamente (SEVERINO *et al.*, 2003).

O radical neutro (MB^\bullet) é um agente redutor já identificado como capaz de reduzir o ferro hemínico de citocromo *c* (Esquema 5) (ESTEVAM *et al.*, 2004).



Esquema 5. Redução de citocromo *c* por MB^\bullet .

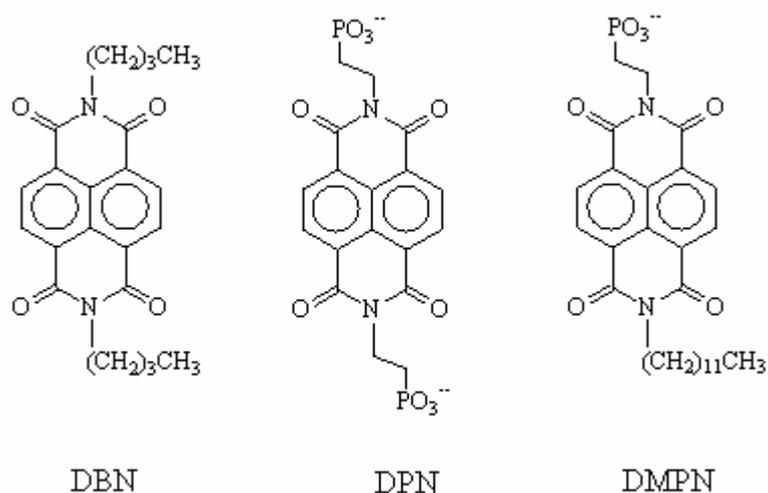
Por essas razões, o azul de metileno tem grande potencial para atuar como redutor fotoquímico dos estados de alta valência de HRP.

1.4. 1,4,5,8-naftalenodiimida (NDI)

1,4,5,8-naftalenodiimidias (NDI) são compostos aromáticos com propriedades fotofísicas e eletroquímicas muito estudadas (VIEHBECK *et al.*, 1990; PENNEAU *et al.*, 1991; GREENFIELD *et al.*, 1996; AVELINE *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1999). Uma das características mais marcantes das NDI é a sua facilidade de redução, gerando radicais livres relativamente estáveis. A redução das NDI pode ser realizada através de métodos químicos (PENNEAU *et al.*, 1991), fotoquímicos (VIEHBECK *et al.*, 1990; GREENFIELD *et al.*, 1996; AVELINE *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1999) ou eletroquímicos (VIEHBECK *et al.*, 1990). Devido a esta facilidade de formação de radicais, existe um interesse muito grande no emprego de NDI na construção de novos materiais. Materiais contendo radicais livres têm diversas aplicações potenciais, como por exemplo, em condutores orgânicos (MILLER *et al.*, 1993), em sistemas para fotossíntese artificial (CLELAND, 1990), como corantes de laser (PENNEAU *et al.*, 1991), entre outras. Na área biológica, tem-se estudado o uso das NDI na terapia fotodinâmica contra o câncer (AVELINE *et al.*, 1997), o que também está relacionado com a formação de radicais livres.

BROCHSZTAIN *et al.*, 1999, têm estudado as propriedades de diferentes NDI, notadamente os derivados *N,N'*-dibutil-1,4,5,8-naftalenodiimida (DBN) e *N,N'*-di(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DPN). Devido aos grupamentos butila, a imida DBN é um composto apolar, solúvel em solventes orgânicos (como o clorofórmio) e essencialmente insolúveis em água. A imida DPN, por outro lado, é substituída com

grupamentos fosfonatos, o que a torna razoavelmente solúvel em água, mas insolúvel em solventes apolares. A imida *N*-dodecil-*N'*-(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DMPN), é uma imida assimétrica, que possui de um lado um substituinte hidrofóbico (grupo dodecil), como no DBN, e do outro um substituinte hidrofílico (ácido fosfônico), análogo ao DPN. Desta forma, o composto DMPN é um composto anfifílico, sendo estruturalmente relacionado com ambos os compostos DBN e DPN. As estruturas de DBN, DPN e DMPN estão representadas no esquema 6.



Esquema 6. Estrutura molecular das NDI.

Independente dos substituintes que alteram a solubilidade, as diimidas aromáticas (NDI) apresentam as seguintes propriedades fotofísicas e fotoquímicas: comprimento de onda de máxima absorção em 383 nm, comprimento de onda de máxima emissão em 393 nm; rendimento quântico de fluorescência de 0,001, primeiro potencial de redução de -0,50 V e segundo potencial de redução de -1,03 (VIEHBECK *et al.*, 1990). O espectro de absorção UV-visível da NDI está apresentado na Figura 6 (MARCON, 2008).

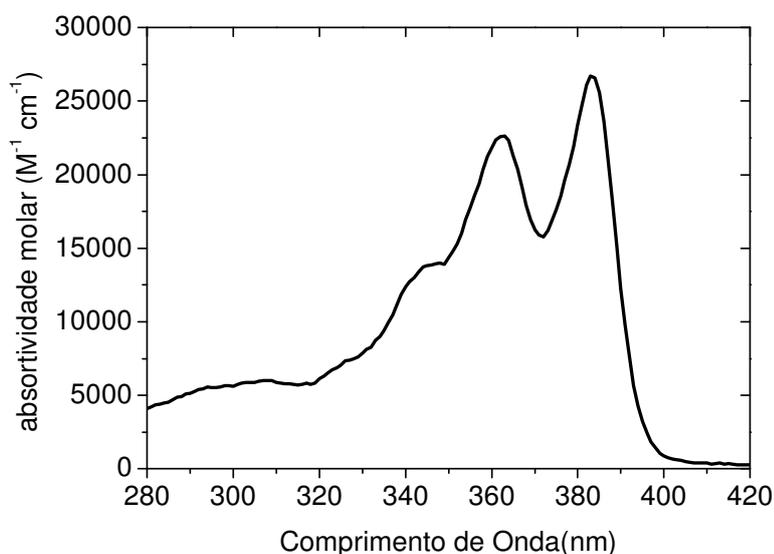


Figura 6. Espectro de absorção da imida DPN em água (MARCON, 2008).

De forma similar ao que foi observado para citocromo *c*, o estado excitado de *N,N'*-di(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DPN) (CAMPOS *et al.*, 2004) e de *N*-dodecil-*N'*-(2-fosfonoetil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (DMPN) (FIGUEIREDO *et al.*, 2005) podem reduzir HRP Composto II ao seu estado nativo e acelerar o ciclo catalítico da enzima.

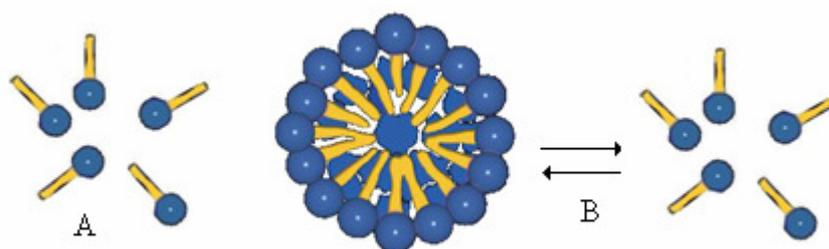
1.5. Surfactantes e Micelas

A interação entre surfactante e proteínas pode causar modificações nas estruturas secundária e terciária e assim influenciar em sua função catalítica (GEBICKA e GEBICKA, 1999).

As moléculas de surfactante são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem duas regiões distintas: uma delas apolar e outra polar ou iônica. Os surfactantes podem ser neutros ou iônicos. Os iônicos podem ser catiônicos, aniônicos ou, ainda, anfóteros, quando ambas as cargas estão presentes no surfactante neutro. A parte

apolar pode diferir no comprimento, conter ligações insaturadas e/ou possuir duas ou mais cadeias carbônicas.

Após certa concentração (concentração micelar crítica - CMC), as moléculas do surfactante, em solução aquosa, passam a se agregar sob a forma de micelas, agregados que apresentam um núcleo apolar, devido as “caudas” hidrofóbicas do surfactante, que são mantidas afastadas das moléculas de água e uma superfície polar, formada pelos grupos hidrofílico do surfactante, que interage com as moléculas de água do meio, como representado no esquema 7.



Esquema 7. Formação de um agregado micelar. **A.** Abaixo da CMC: prevalência de monômeros. **B.** Acima da CMC: prevalência de micelas.

Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3-6 nm o que representa de 30-200 monômeros. A CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura, etc). As micelas são, portanto, agregados termodinamicamente estáveis, formados espontaneamente por compostos anfifílicos acima de uma determinada concentração e em uma determinada condição de temperatura (PELIZZETTI e PRAMAURO, 1985).

As micelas são desconstituídas pela diluição com água quando a concentração do tensoativo se torna abaixo da CMC. O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações, e pode ser detectado

pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do tensoativo como a tensão superficial, pressão osmótica e condutividade (só para tensoativos iônicos) (MANIASSO, 2001).

A dissolução de um tensoativo em água provoca o surgimento de interações desfavoráveis entre sua parte apolar e o solvente, devido a: (i) alta tensão interfacial água/hidrocarboneto, (ii) estruturação das moléculas de água ao redor da cadeia hidrofóbica e (iii) diminuição nos graus de liberdade da cadeia hidrofóbica (TANFORD, 1991; MOROI, 1992).

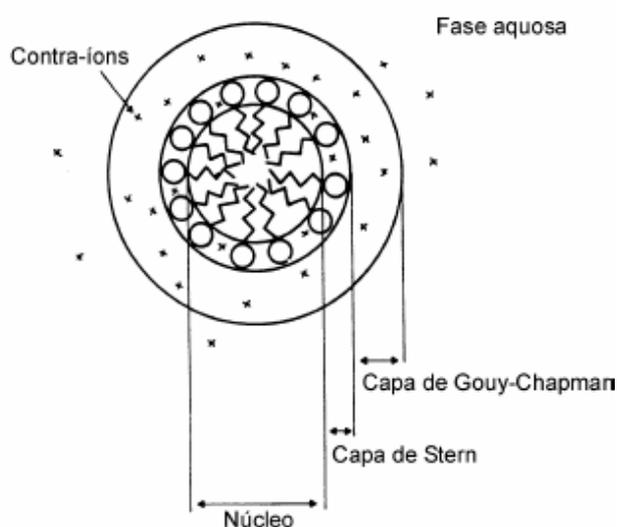
Os monômeros dos tensoativos tendem a adsorver nas interfaces (líquido-vapor, líquido-sólido ou líquido-líquido), de modo a reduzir a energia livre total do sistema (GAINES, 1996; TIEN, 1974). Nessa adsorção, as cadeias de hidrocarbonetos ficam voltadas para fora da solução e os grupos hidrofílicos permanecem na interface aquosa (ELWORTHY, 1968).

No fenômeno de adsorção, ocorre a substituição de moléculas de água presentes na interface pelo grupo hidrofóbico do tensoativo. Como as forças intermoleculares de atração entre uma molécula de água e um grupo apolar são menores do que entre duas moléculas de água, reduz-se o poder de contração da superfície, ou tensão superficial (ATTWOOD e FLORENCE, 1983).

O número de monômeros adsorvidos na superfície determina a extensão do abaixamento da tensão superficial. Após a saturação na interface solução-ar, aumentando-se ainda mais a concentração do tensoativo, os monômeros presentes no seio da solução começam a associarem-se em dímeros, trimeros, tetrâmeros, o que elimina uma parte do contato água/óleo, diminuindo a energia livre do sistema.

O núcleo micelar é semelhante a uma gotícula de hidrocarboneto líquido (MANIASSO, 2001). O núcleo é envolvido pela camada de Stern, que contém os

grupos iônicos e também 50 a 80% dos contra-íons, conferindo a micela uma carga residual. A camada de Stern é envolvida por uma dupla camada elétrica difusa, denominada de dupla camada de Gouy-Chapman e que contém os restantes dos contra-íons solvatados (PELIZZETTI e PRAMAURO, 1985). Os contra-íons contidos nesta e na camada de Stern, podem trocar de posição com os íons da solução, pois ambos se encontram em equilíbrio (FENDLER e FENDLER, 1975). O esquema 8 representa esquematicamente uma micela aquosa.



Esquema 8. Representação esquemática de uma micela aquosa (TANFORD, 1991).

Vários modelos foram propostos na tentativa de explicar as propriedades e características das micelas. O modelo mais aceito, é o modelo de Dill e Flory, o qual leva em consideração a mobilidade das cadeias carbônicas. As características das micelas de acordo com este modelo são: (i) em média todos os grupos apolares do tensoativo micelizado estão no núcleo micelar. (ii) os grupos polares iônicos e a água são quase totalmente excluídos do núcleo micelar. (iii) os grupos hidrofóbicos apresentam desordem conformacional (no estado líquido) e preenchem o núcleo micelar com densidade aproximadamente igual a dos n-alcanos líquidos. (iv) a

interface água-grupos hidrofóbicos é da ordem de alguns Å e (v) a camada contendo os grupos polares é pouco rugosa (GRUEN, 1985).

As micelas de cetil trimetil amônio, CTAB, possuem as seguintes características, sua fórmula molecular é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$, sendo seu peso molecular aproximadamente 363,9 g/mol, é um surfactante monocaudado catiônico, possui número de agregação aproximadamente igual a 100 e sua CMC em água pura é de aproximadamente 0,9 mM (DEGIORGIO e CORTI 1985).

A literatura mostra que a associação de micelas de CTAB com microperoxidases forma um agregado supramolecular com propriedades de peroxidase, sendo que o núcleo micelar mimetiza o bolsão hidrofóbico ocupado pelo grupo heme nas peroxidases (PRIETO *et al.*, 2004a; PRIETO *et al.*, 2004b). A interface alcalina proporcionada pela micela catiônica também favorece a reação, pois os prótons constituem inibidores competitivos da enzima. A influência das micelas de CTAB sobre diferentes porfirinas (GUANDINI *et al.*, 1999) tem sido estudada. Dessa maneira, esse surfactante pode interferir no ciclo catalítico da HRP.

1.6. Justificativa

Pelo que foi anteriormente exposto podemos observar que apesar de haver estudos sobre a reação de HRP com inúmeros substratos redutores químicos, a literatura carece de estudos envolvendo redutores fotoquímicos, tais como, os com citocromo *c* na presença de MB^+ (ESTEVAM *et al.*, 2004) e imidas aromáticas (CAMPOS *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2005). Além disso, há poucos trabalhos do comportamento do ciclo catalítico da enzima em meio heterogêneo. Dado o amplo potencial de aplicação destes sistemas em biotecnologia, o presente trabalho

caracteriza sistemas catalíticos formado por HRP frente a mediadores fotoredutores e a catálise em meio heterogêneo.

2. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo a caracterização e a construção de modelos do ciclo catalítico da peroxidase de raiz forte (HRP) na presença de agentes redutores ativados fotoquimicamente. Os agentes fotorredutores utilizados foram o azul de metileno, MB^+ , e as imidas aromáticas, DPN e DMPN. No caso das imidas aromáticas foi também realizado um estudo comparativo em meio homogêneo e heterogêneo de micelas de CTAB. Estes objetivos foram atingidos por meio das seguintes estratégias:

Azul de Metileno:

- Determinação da velocidade de redução de HRP Composto II à forma nativa na presença e na ausência de diferentes concentrações de MB^+ irradiado e no escuro bem como na presença e na ausência de oxigênio.
- Efeito do pH sobre a velocidade do ciclo catalítico do sistema HRP/ MB^+ .
- Determinação do tempo de vida e espectros das espécies triplete de MB^+ na presença de HRP nativa e de HRP Composto II. Determinação do tempo de vida e espectros do radical semi reduzido gerado por HRP composto II.
- Caracterização do estado de spin dos intermediários do sistema HRP/ MB^+ no escuro e na presença de luz, e na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio, por meio da técnica de EPR.

Imidas aromáticas:

- Estudo espectral e cinético do ciclo catalítico da HRP, na presença e na ausência das imidas DPN e DMPN irradiadas e no escuro, em meio homogêneo (tampão fosfato de sódio), e em meio heterogêneo de micelas de CTAB em tampão fosfato de sódio.
- Avaliação das alterações estruturais que acompanham a enzima em meio heterogêneo e na presença de imida.
- Estudo do processo de transferência de elétrons entre a imida e a enzima.
- Caracterização do ciclo catalítico da HRP mediado pelas imidas aromáticas fotoexcitadas por meio da técnica de EPR, conforme descrito previamente para o MB⁺.

3. MÉTODO

3.1. Reagentes

- Horseradish peroxidase (HRP) - PM 44000 g/mol (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma)
- Azul de metileno (Aldrich)
- Micelas de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) (Sigma)
- 1,4,5,8-naftalenodiimidaz (NDI)
- Guaiacol (2 metoxifenol) – MM 124,14 g/mol (Sigma)
- Fosfato de sódio dibásico – MM 268,07 g/mol (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico – MM 137,99 g/mol (Sigma)
- Soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M
- Soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M
- Ditionito de sódio (Sigma)
- Água deionizada – sistema Milipore

3.2. Preparo de Soluções

Preparo da solução estoque de HRP

A solução foi preparada pela dissolução de HRP em água deionizada, sendo a concentração verificada através do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{403} = 1,02 \times 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$.

Preparo da solução de Azul de Metileno

A solução foi preparada pela dissolução de azul de metileno em água deionizada, sendo a concentração verificada através do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{604} = 8,00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Preparo de 1,4,5,8,-naphthalediimidaz (DMPN e DPN)

Síntese da imida DMPN

A síntese foi realizada em duas etapas, sendo a primeira delas realizada por meio de refluxo em *N,N*-dimetilformamida (DMF):

1ª Etapa: Uma suspensão do dianidrido 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico (4,26 g, 15,9 mmol) em DMF (20 mL) foi aquecida a 120-140 °C. A esta suspensão foi adicionada por gotejamento durante uma hora uma solução de *n*-dodecilamina (0,589 g, 3,18 mmol) em DMF (10 mL). A mistura foi aquecida por mais 1 h, resfriada e despejada em 300 mL de éter etílico, resultando na precipitação de um sólido marrom claro. Este sólido foi filtrado, lavado com éter etílico e seco a vácuo. A monimida foi extraída da mistura sólida, a qual continha um excesso de dianidrido, com quatro porções de clorofórmio (50 mL). Com a evaporação do clorofórmio, resultou em 1,10 g de *N*-dodecil-1,4,5,8-naftalenotetracarboxilmonimida (2,54 mmol, 80% de rendimento), que foi utilizada sem purificação para o segunda etapa. Ponto de fusão > 400°C. Análise elementar calculada (encontrada): 65,9% C (71,7%); 6,14% H (6,67%); 3,89% N (3,22%). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8,56 (dd, 2H, Ar); 8,19 (dd, 2H, Ar); 4,03 (t, 2H, α -CH₂); 1,65 (largo, 2H, β -CH₂); 1,30 (largo, 2H, γ -CH₂); 1,23 (largo, 16H, CH₂); 0,84 (t, 3H, CH₃).

2^a Etapa: uma mistura contendo a monoimida *N*-dodecil-1,4,5,8-naftalenotetracarboxilmonoimida (500 mg, 1,15 mmol), ácido 2-aminoetilfosfônico (AEPA) (173 mg, 1,38 mmol) e imidazol (2,5 g) foi aquecida a 120 -140 °C durante 1 h. Esta mistura foi resfriada e a ela foi adicionada 30 mL de uma mistura etanol: HCl 2 mol/L (1:1). O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol gelado e depois seco, resultando em 578 mg do produto, que foi obtido com sal imidazólico (0,95 mmol, 83% de rendimento). A tentativa de converter o produto para a forma de ácido fosfônico livre não teve sucesso e o DMPN foi por isto utilizado neste trabalho como sal imidazólico. Ponto de fusão > 400°C. Análise elementar: calculado para DMPN·Im (encontrado) 57,0% C (61,0%); 5,97% H(6,39%); 9,47% N (9,18%). ¹H-RMN (ácido-*d* trifluoracético), δ (ppm): 8,94 (s, 4H, Ar); 8,67 (s, 1H, imidazol); 4,75 (m, 2H, α-CH₂, etilfosfonato); 4,32 (t, 2H, α-CH₂, dodecil); 2,67 (m, 2H, β-CH₂, etilfosfonato); 1,82 (largo, 2H, β-CH₂, dodecil); 1,44 (largo, 2H, γ-CH₂, dodecil); 1,29 (largo, 16H, CH₂, dodecil); 0,86 (largo, 3H, CH₃, dodecil). Absorção UV/Vis (H₂O), λ_{máx} (ε, M⁻¹cm⁻¹): 383 nm (14000); 362 nm (11300); 347 nm (ombro, 6500); 235 nm (15600); 207 nm (28500).

A imida DMPN na forma liofilizada foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 6,0 para a concentração final de 24 μM. Dissolução completa após agitação por 10 minutos.

Síntese da imida DPN

Uma mistura do dianidrido 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico (107 mg, 0,40 mmol), ácido 2-aminoetilfosfônico (AEPA) (100 mg, 0,8 mmol) e imidazol (0,5 g) foi aquecida à 130 °C por 10 min. Após resfriamento, 10 mL de uma solução de etanol: HCl 2 mol/L (1:1) foi adicionada ao meio reacional. O sólido resultante foi filtrado,

lavado com etanol (20 mL) e seco a vácuo, resultando em 103 mg de DPN (0,21 mmol, 54% de rendimento), como um fino sólido salmão claro. Ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$) (sal dissódico, D_2O), δ (ppm): 8,46 (s, 4H, Ar); 4,31 (m, 4H, N- CH_2); 2,08 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-P}$). Análise elementar (CHN), calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (encontrada): 41,70% C (41,96%); 3,86% H (3,95%); 5,41% N (4,85%).

A imida DPN na forma liofilizada foi dissolvida para a concentração final de 1,0 mM, em tampão Fosfato de Sódio 5,0 mM pH 6,0. Dissolução completa após agitação por 1 minuto.

Preparo da solução de guaiacol

O guaiacol puro (2 metoxifenol) foi diluído em água para uma concentração de 1mM. A formação do produto (guaiacol oxidado) foi acompanhada em 470 nm ($\epsilon_{470} = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Preparo das micelas de CTAB

Purificação do CTAB

Foi preparada uma solução de 0,28 M de CTAB em acetona / etanol (85% e 15% em volume, respectivamente). Para obtenção de uma solução translúcida, dissolveu-se o CTAB em acetona, sob aquecimento e agitação. No momento de refluxo, foram adicionadas alíquotas de etanol. Em seguida, a solução foi filtrada e permaneceu em repouso para evaporação do solvente. O precipitado foi filtrado a

vácuo, e lavado com acetona por duas vezes, estando assim o CTAB recristalizado e purificado (DEARDEN e WOOLLEY, 1987).

Preparo da solução de CTAB

As micelas de CTAB foram preparadas pela diluição de CTAB purificado em tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 8,0 à temperatura de 37^o C. As concentrações de CTAB são descritas nos respectivos experimentos.

Preparo da solução de Ditionito de Sódio

A solução de 1,0 mM foi preparada pela dissolução de ditionito de sódio em meio heterogêneo (micelas de CTAB / tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 6,0).

3.3. Sistema de Irradiação

As amostras contendo azul de metileno foram irradiadas em uma câmara fechada com controle de temperatura, com uma lâmpada de halogênio 500 W, a uma distância de 30 cm da amostra.

As amostras contendo as imidas foram irradiadas com uma lâmpada compacta de 4 Watts, em 365 nm, modelo UVGL-25 (UVP), Mineralight (Upland, EUA). Para o estudo espectral e cinético as amostras foram irradiadas diretamente no espectrofotômetro.

3.4. Cinética Enzimática

Os dados cinéticos estão representados através da média de três medidas independentes, a 403 nm (pico da banda Soret da HRP nativa).

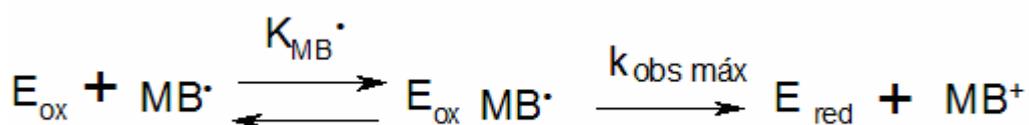
Azul de Metileno:

A conversão de HRP Composto II à forma nativa, para os experimentos realizados com o corante azul de metileno pode ser modelada por uma correlação de primeira ordem representada pela equação 1:

$$\Delta A_{403nm} = \lim(1 - e^{(-k_{obs} * t)}) \quad (\text{eq. 1}),$$

onde, ΔA_{403nm} e o *lim* são proporcionais as concentrações de regeneração da forma nativa da HRP, dadas num certo tempo e num tempo infinito, e k_{obs} é a constante de velocidade de primeira ordem observada para a conversão de HRP Composto II à forma nativa.

A influência da concentração do corante (azul de metileno) na velocidade de conversão da HRP Composto II à forma nativa da enzima pode ser modelada pela equação 2:



$$k_{obs} = \frac{k_{obs \text{ máx}} * [MB]}{K_{MB} + [MB]} \quad (\text{eq. 2}),$$

onde, k_{obs} é a velocidade de conversão observada de HRP Composto II à forma nativa, $k_{obs \text{ máx}}$ é a velocidade máxima, $[MB]$ é a concentração do corante, e K_{MB} é a constante de pseudoequilíbrio ou dinâmica aparente da complexação entre HRP Composto II e o corante.

A influência do pH na velocidade de conversão da HRP Composto II à forma nativa pelo peróxido de hidrogênio, pode ser modelada pela equação 3:

$$k_{obs} = \frac{\lim(10^{pH-pK_a})}{10^{pH-pK_a} + 1} \quad (\text{eq. 3}),$$

onde, o limite (*lim*) igual a velocidade máxima independe do valor de pH e k_{obs} é a velocidade de primeira ordem aparente da conversão de HRP Composto II à forma nativa.

Imidas Aromáticas:

A conversão de HRP Composto II à forma nativa de HRP, foi monitorada pelo aumento de absorvância em 403 nm. Como a imida e a HRP absorve em regiões próximas, foi realizada a subtração da contribuição da imida.

A área gerada para cada concentração de imida utilizada foi calculada pelo programa computacional *Origin 6.0*.

Os tratamentos cinéticos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Ivarne L. S. Tersariol do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidade de Mogi das Cruzes

3.5. Simulação Computacional

As simulações de *Docking* foram realizadas por meio do *software* ArgusLab (THOMPSON, 2006), com a colaboração do prof. Dr. Cláudio S. Shida do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidade de Mogi das Cruzes. O modelo da HRP 1H55 foi obtido de um Banco de Proteínas. O ligante molecular foi o MB⁺ em sua forma neutra.

3.6. Técnicas Analíticas Utilizadas

Espectrofotometria

Os espectros foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1501 MultiSpec (Tóquio, Japão), com exatidão em torno de 1 nm e 0,002 Abs, em cubeta de caminho óptico de 10 mm. As cinéticas foram acompanhadas, com leituras em intervalos de 5 segundo. Quando necessário, foi injetado argônio no sistema para remover o oxigênio.

***Flash* Fotólise**

Os dados de *flash* fotólise foram obtidos através de um sistema de Nd:YAG laser (Spectron Laser System, Warwick-shire, UK), operando a 532 nm, pulso de 30 mJ/pulso, por meio de uma lâmpada de 150 W de Xe. Foi injetado argônio no sistema para remover o oxigênio. Essas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química-USP, em São Paulo (Os detalhes da técnica estão descritos no Apêndice).

Dicroísmo Circular

As medidas de Dicroísmo Circular (CD) foram realizadas utilizando o espectropolarímetro JASCO J-720, utilizando os seguintes parâmetros: intervalo de leitura entre 240 e 460 nm, resolução de 0,5 nm, velocidade de leitura 50 nm / min. O comprimento do caminho óptico foi de 0,1cm em todas as medidas. Essas análises foram realizadas em colaboração com a Prof. Dr. Adelaide Faljoni-Alário no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química-USP, em São Paulo.

Espectrofluorescência

A intensidade de fluorescência foi medida e registrada no espectrofluorímetro Hitachi F 2500 (Tóquio, Jp), utilizando os seguintes parâmetros: velocidade da leitura em 300 nm / min com intervalo dos dados de 1 nm, voltagem em 400 V, fenda de excitação 10 nm, fenda de emissão 5 nm. O comprimento do caminho óptico foi de 10 mm em todas as medidas. Nos experimentos realizados para investigar a fluorescência do triptofano da enzima o comprimento de excitação foi em 290 nm e o de fluorescência medido no intervalo de 300 a 450 nm. Nos experimentos realizados para investigar a fluorescência das imidas o comprimento de excitação foi em 310 nm e o de fluorescência medido no intervalo de 315 a 500 nm.

Ressonância Paramagnética

As medidas de ressonância paramagnética (EPR) foram obtidas por meio de um equipamento de ressonância paramagnética eletrônica de onda contínua com banda X da linha Elexsys da Bruker, com acessório da Oxford para variação de temperatura, desde a temperatura ambiente até hélio líquido (4 K) sob as seguintes condições: campo 5×10^3 T, amplitude de modulação 1,0 mT, microondas 10,08 mW, constante de tempo de 10,24 ms e tempo de conversão de 40,96 ms. Após mistura, as soluções foram rapidamente introduzidas em um tubo de quartzo especial para EPR, o qual foi previamente resfriado com nitrogênio líquido. Depois de congelada a amostra foi introduzida na cavidade de microondas, submetido à baixa temperatura e as medidas de EPR foram então realizadas. Essa técnica foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Otaciro Rangel do Nascimento, no Instituto

de Física da Universidade de São Paulo, em São Carlos (Os detalhes dessa técnica estão descritos no Apêndice).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados em três partes: a primeira relativa aos estudos do fotorredutor, MB^+ , como agente redutor dos intermediários de alta valência da HRP; a segunda relativa aos estudos do fotorredutor, imida aromática, como agente redutor dos intermediários de alta valência da enzima, na presença e na ausência de micelas de CTAB; e a terceira parte mostra a caracterização do intermediário, oxiferril π cátion, formado no ciclo catalítico da HRP pela técnica de RPE pulsada.

4.1. Parte 1 – Caracterização do Ciclo Catalítico da HRP Utilizando-se Azul de Metileno Fotoativado Como Agente Redutor

4.1.1. Estudo espectral

As mudanças espectrais de HRP e azul de metileno, MB^+ , na presença de peróxido de hidrogênio e sob irradiação estão representadas na Figura 7A. A linha preta representa o espectro de HRP na presença de MB^+ anteriormente à adição de peróxido de hidrogênio. O espectro da HRP, na presença de MB^+ , permanece inalterado na ausência de peróxido de hidrogênio em ambos os casos, isto é, no escuro e irradiado. O discreto “ombro” em 380 nm é característico da quinta coordenação de Fe(III) em peroxidases. A adição de peróxido de hidrogênio provoca mudanças no espectro da HRP compatível com a formação de HRP Composto II (linha vermelha) sendo a banda Soret (γ) deslocada de 403 a 418 nm, como previamente demonstrado na figura 3 (introdução). A absorção em 418 nm é menos intensa do que em 403 nm isto se deve ao fato de uma população da enzima

não ter sido convertida para HRP Composto II. As mudanças nas bandas α entre 550-604 nm (no amarelo) e β entre 520-546 nm (no verde), descrita na literatura (DUNFORD, 1999), não são claramente evidenciadas devido à sobreposição com o espectro do MB^+ . A banda Soret em 418 nm é característica de HRP Composto II, ou seja, quando há peróxido de hidrogênio no meio reacional. O retorno da banda Soret a 403 nm evidencia a depleção do peróxido. A irradiação da amostra com uma lâmpada de halogênio de 500 W induz o rápido retorno da HRP Composto II à forma nativa ($k_{\text{obs}} = 0,395 \text{ min}^{-1}$). A Fig. 7B mostra o espectro de HRP e MB^+ durante a reação com peróxido de hidrogênio no escuro. O estado nativo de MB^+ não é capaz de afetar a velocidade de retorno de HRP Composto II a forma nativa ($k_{\text{obs}} = 0,066 \text{ min}^{-1}$), o que é compatível somente com peróxido de hidrogênio como espécie redutora. No curso da reação irradiada (Fig. 7A), MB^+ exibe um deslocamento de sua banda de 5 nm para o azul (de 665 a 660 nm). A intensidade de absorbância do pico da banda a 665 nm também sofreu alteração de 0,54 para 0,42. Essas mudanças espectrais de MB^+ não foram observadas durante o ciclo catalítico da HRP no escuro (Fig. 7B). Esse resultado sugere que o corante deve estar sendo consumido no decurso da reação. O deslocamento da banda de MB^+ para o azul (Fig. 7A) pode ser atribuído à formação de fotoprodutos provenientes da forma oxidada do corante ou da reação de MB^+ e MB^{2+} com a estrutura protéica, como tem sido observado com outros corantes carregados positivamente (BAPTISTA e INDIG, 1998). O espectro de UV-visível da HRP associada ao MB^+ (Figura 7) não sugere a formação de dímeros do corante (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

Os seguintes controles foram realizados: somente azul de metileno irradiado e azul de metileno mais peróxido de hidrogênio irradiado, em ambos os casos os espectros de UV-visível não apresentaram mudanças (resultado não mostrado).

Os resultados da Figura 7 indicam que o estado excitado de MB^+ está envolvido na redução de intermediários de alta valência da HRP, Composto I e II.

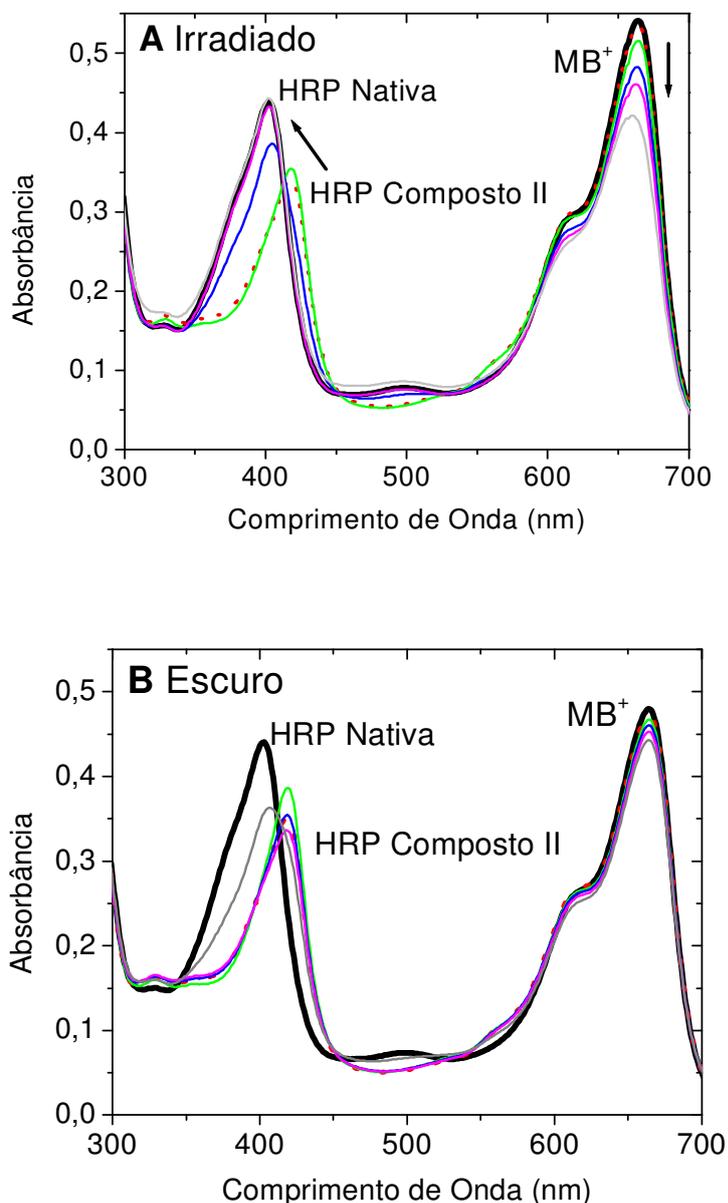


Figura 7. Espectro UV-visível de HRP e azul de metileno no curso da reação com peróxido de hidrogênio. A) Sistema irradiado. B) Sistema não irradiado. A linha preta representa a HRP em seu estado nativo na presença de azul de metileno. A linha vermelha pontilhada representa a formação de HRP Composto II formada imediatamente após adição de peróxido de hidrogênio. As linhas, verde, azul, rosa e cinza representam a reação após 1, 5, 10 e 20 minutos após a adição do peróxido de hidrogênio. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 8,0 a 30 °C. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e MB^+ foram 6 μM , 4 μM e 6,8 μM , respectivamente.

4.1.2. Efeito do pH sobre a redução de HRP Composto II na presença e na ausência de MB⁺ fotoativado

A participação do estado excitado de MB⁺ como agente redutor no ciclo da HRP se torna evidente também, quando se compara a curva de pH para a redução de HRP Composto II na presença e na ausência de MB⁺ fotoativado (Fig. 8).

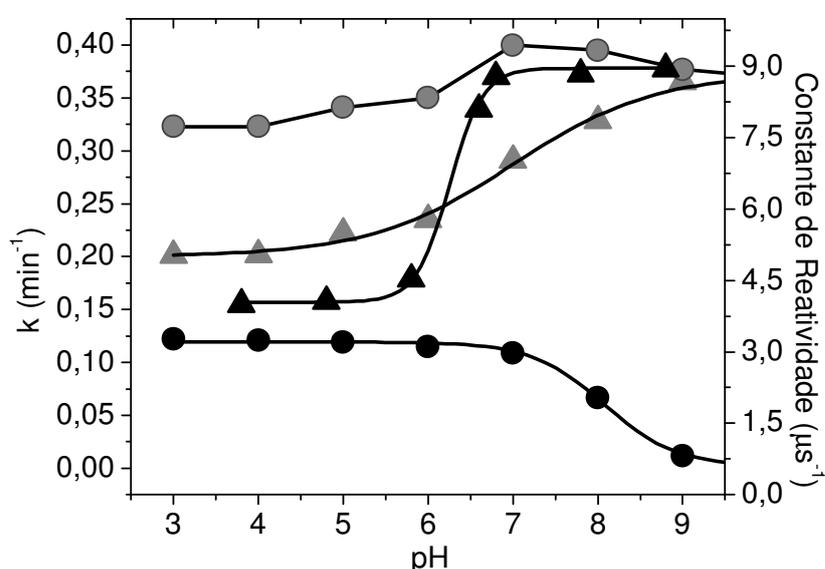


Figura 8. Perfil da velocidade de regeneração de HRP nativa a partir de HRP Composto II em função do pH e perfil da reatividade do MB⁺ triplete em função do pH. Os círculos pretos (●) representam o perfil de pH do decaimento espontâneo de HRP Composto II ($pK_{aobs} = 8,3$); círculos cinza (◐) representam o perfil de pH do decaimento de HRP Composto II na presença de MB⁺ sob irradiação; os triângulos cinza (▲) representam a subtração da curva de pH obtida na presença de MB⁺ sob irradiação da curva de pH para o decaimento espontâneo da HRP Composto II. Os triângulos pretos (▲) representam o perfil da reatividade do MB⁺ triplete em função do pH obtido como o inverso do tempo de vida do triplete ($1/\text{tempo de vida}$) a diferentes valores de pH. As reações foram realizadas em tampão acetato de sódio 5 mM (pH 3,0-5,0), fosfato de sódio 5mM (pH = 3,0, pH 6,0-7,0 e 11,0-13,0) e hidróxido de amônio 5 mM (pH 8,0-10,0), a 30°C. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e MB⁺ foram 6 μM, 4 μM e 6,8 μM, respectivamente.

Na Figura 8, a curva de pH para o ciclo da HRP, na qual peróxido de hidrogênio foi usado tanto como agente oxidante e redutor, como esperado para a HRP C (NAKAGIMA e YAMAZAKI, 1987), a reação apresenta uma curva de pH com pKa entre 8,0 e 8,5 (círculo preto). Na presença de MB⁺ fotoativado (círculo cinza), a curva de pH para o ciclo da HRP revelou um aumento na velocidade da reação em toda a faixa de pH estudada. Nesta condição, a velocidade máxima é obtida em pH 7,0. A subtração da curva de pH obtida na presença do fotoativado (círculo cinza) da curva de pH obtida na ausência de MB⁺ fotoativado (círculo preto) resulta em uma curva com inflexão (obtida por ajuste) em pH em torno de 6,25 (triângulo cinza). O valor de pKa ~ 6,25 coincide com o valor obtido pelo plote da constante de reatividade observada (k_{obs}) de MB⁺ triplete (triângulo preto) em função de pH. Esses resultados indicam que o radical neutro MB[•] está agindo como agente redutor dos intermediários de alta valência de HRP. A possibilidade de que íon superóxido, gerado por transferência de elétron de MB[•] para oxigênio molecular, seja o agente redutor pode ser excluída, uma vez que a reação é favorecida em atmosfera de argônio (Fig. 9 A, B e C).

4.1.3. Efeito da concentração de MB⁺, na ausência e na presença de oxigênio, sobre a velocidade de redução de HRP Composto II

O efeito da concentração de MB⁺, na ausência e na presença de oxigênio, sobre a velocidade de redução de HRP Composto II (Fig. 9A, B e C) foi investigado. A Figura 9, A e B, representa a regeneração temporal de HRP nativa pelo MB⁺ fotoativado em meio saturado com argônio e equilibrado com ar atmosférico, respectivamente. Pode-se observar que, em ambas as condições, o MB⁺ fotoativado induz a regeneração de HRP nativa de maneira dependente da concentração e do

tempo. A constante de velocidade aparente para a regeneração de HRP nativa pelo MB⁺ fotoativado, em meio saturado de argônio (círculo preto) e ar (círculo branco), foi medida em função da concentração de MB⁺ (Fig. 9C). Em ambas as condições, a curva de velocidade de reação em função da concentração de MB⁺ exibe saturação o que sugere uma ligação, possivelmente não covalente, entre MB⁺ e a estrutura da HRP. O esquema 9 descreve o modelo de interação entre a HRP e o corante; a constante de dissociação (K_{MB}) observada para a ligação, entre o corante e a HRP foi de $(5,4 \pm 0,6) \mu\text{M}$ e $(0,57 \pm 0,05) \mu\text{M}$ em meio saturado de argônio e ar, respectivamente. Em meio saturado com argônio a velocidade de conversão de HRP Composto II para HRP nativa foi significativamente maior ($k_{\text{obs máx}} = 2,1 \pm 0,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) que a obtida em meio equilibrado com ar ($k_{\text{obs máx}} = 0,73 \pm 0,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Este resultado é coerente, uma vez que oxigênio molecular é supressor da espécie triplete (SEVERINO *et al.*, 2003) que, nesta reação pode ser o precursor da espécie redutora da enzima. Oxigênio molecular pode também oxidar MB[•] e impedir a transferência de elétrons do corante para a enzima. É importante também salientar que o meio saturado com argônio pode não gerar a completa depleção do oxigênio molecular e o valor obtido para $k_{\text{obs máx}}$ é aparente. Considerando essas condições, a eficiência promovida pelo MB⁺ fotoativado na regeneração de HRP nativa foi respectivamente determinada em meio equilibrado com argônio e ar: $k_{\text{obs máx}}/K_{MB} = 3,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $12,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A maior eficiência catalítica observada em meio equilibrado com o ar provém da maior afinidade exibida pela HRP ao corante nesta condição ($K_{MB} \sim 10 \text{ s}^{-1}$).

Considerando o esquema 9, a presença de oxigênio molecular causa um aumento da razão entre $[\text{MB}^+]/[\text{MB}^\bullet]$, o que extingue o estado triplete do corante e/ou oxida o radical neutro. A hidrofobicidade do MB⁺ pode ser responsável pela afinidade

do corante pelo bolsão do heme, reforçada pela interação com os aminoácidos vizinhos que são carregados negativamente. A perda da carga positiva depois da conversão de MB^+ para a forma reduzida (MB^\bullet) pode diminuir a afinidade pela enzima, porém ao mesmo tempo, favorece a transferência do elétron para o grupo oxiferril.

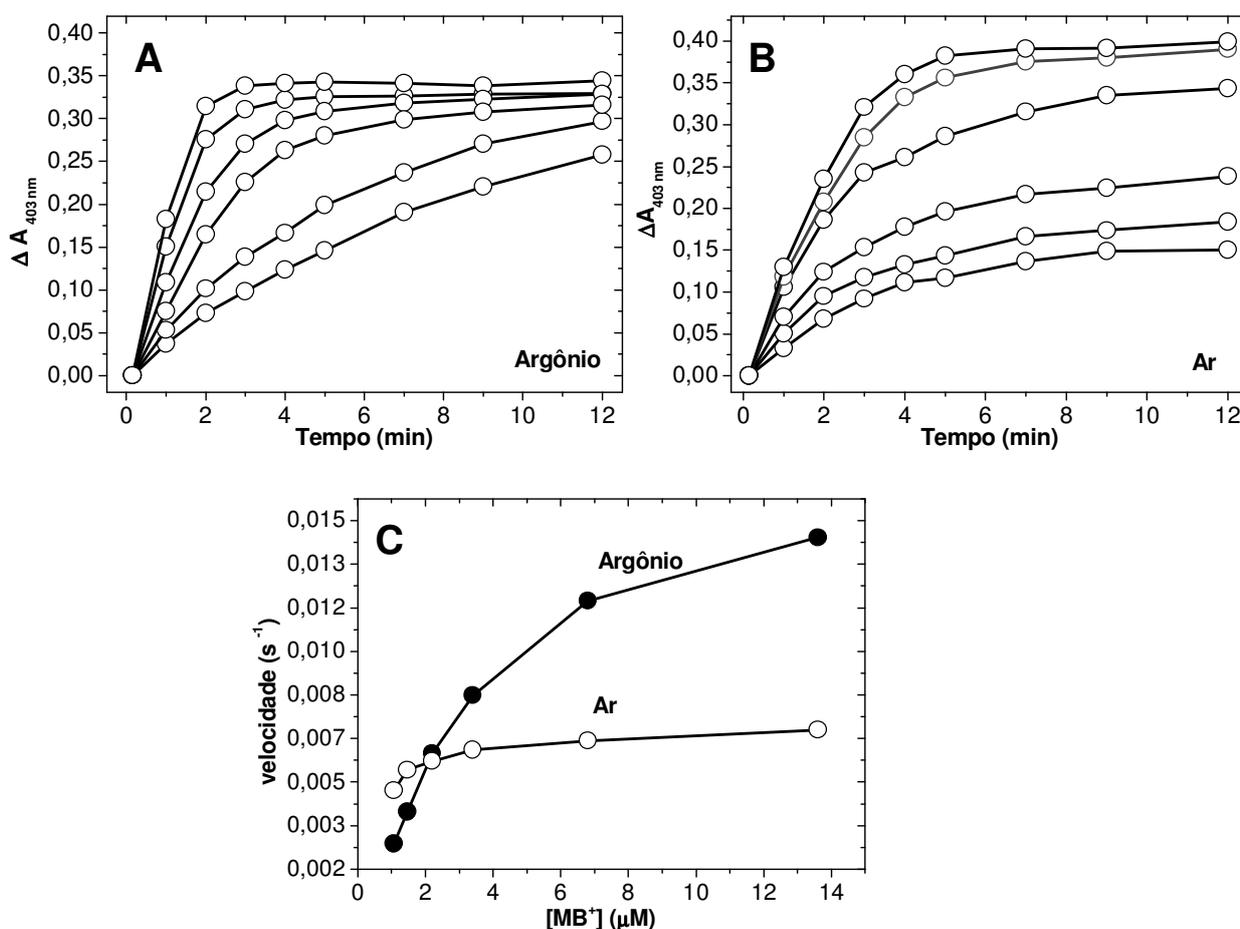
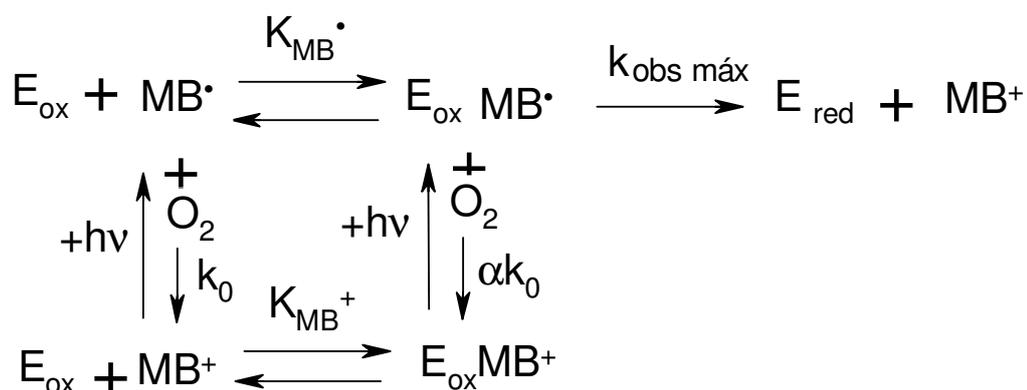


Figura 9. Efeito da concentração de MB^+ e oxigênio molecular na velocidade de decaimento de HRP Composto II à forma nativa. A - Cinética de regeneração de HRP na presença de 1,05, 1,5, 2,2, 3,4, 6,8 e 13,6 μM de MB^+ , em meio com argônio. B - O mesmo experimento conduzido com ar. C - Curva da velocidade de regeneração da HRP nativa em função da concentração de MB^+ , obtida por regressão não linear. Os círculos pretos (\bullet) representam os resultados obtidos em meio saturado de argônio e os círculos brancos (\circ) representam os resultados obtidos em meio saturado com ar. Nos meios saturados com argônio e ar, o $k_{\text{obs máx}}$ obtido a partir da Eq. 1 foram: $k_{\text{obs máx}} = 2,1 \pm 0,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, e $k_{\text{obs máx}} = 0,73 \pm 0,02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 8,0 a 30 °C. As concentrações de peróxido de hidrogênio e HRP foram 6 μM e 4 μM , respectivamente.



Esquema 9: Modelo de interação entre a HRP e o corante. E_{ox} representa a HRP Composto II, MB^{\bullet} , representa o radical neutro, MB^+ , representa o azul de metileno em seu estado fundamental e E_{red} representa a HRP em seu estado nativo.

Esses resultados também excluem que o íon superóxido esteja agindo como agente redutor das formas de alta valência de HRP. Assim, há duas possibilidades para a fotogeração de MB^{\bullet} ser capaz de reduzir intermediários de alta valência de HRP: i) abstração de um elétron de outro MB^+ molecular próximo (JUNQUEIRA *et al.*, 2002), ii) abstração de um elétron do aminoácido da cadeia protéica.

4.1.4. Caracterização das espécies transientes do MB^+ fotoativado

A análise dos resultados de *flash* fotólise da reação contribuiu para elucidar as espécies de MB^+ responsáveis pela redução dos intermediários de alta valência de HRP. A Figura 10A e B mostra o espectro transiente de 15 μM de MB^+ excitado na ausência de HRP (círculo branco) e na presença de 15 μM de HRP nativa (círculo preto) obtidos a 5 e 10 μs após o pulso de laser (Fig. 10A e B, respectivamente). Em ambas as Figuras, é clara, que a presença de HRP provocou mudanças significativas no espectro de MB^+ triplete. A HRP diminui a contribuição do sinal do MB^+ triplete (região de 400 – 420 nm) e favorece a contribuição do sinal de MB^{\bullet} (região de 430 – 525 nm) nos espectros obtidos imediatamente após a excitação de

MB⁺ pelo pulso de laser (SEVERINO *et al.*, 2003). O tempo de vida do MB⁺ triplete, medido a 420 nm, foi de aproximadamente 10 μs na ausência de HRP e 7,0 μs na presença da enzima. Esses resultados sugerem que a ligação entre as moléculas de MB⁺ e a estrutura da HRP favorece o decaimento do MB⁺ triplete via abstração de elétron. Neste caso, um MB⁺ triplete próximo da estrutura da enzima poderia abstrair um elétron de outra molécula de MB⁺ vizinha excitada ou o MB⁺ excitado poderia abstrair um elétron do resíduo de um aminoácido da HRP.

A Fig. 10C mostra o decaimento do sinal de MB[•] na presença da HRP nativa e na presença de HRP Composto I e II produzidos pela adição de peróxido de hidrogênio no meio reacional. O tempo de vida do MB[•] foi de 7,5 μs na ausência de HRP e na presença de 15 μM de HRP nativa convertida à HRP Composto II pela adição de peróxido de hidrogênio, esse tempo de vida do MB[•] caiu para 2,0 μs. Este resultado corrobora que MB[•] gerado fotoquimicamente é o agente redutor das formas de alta valência da HRP.

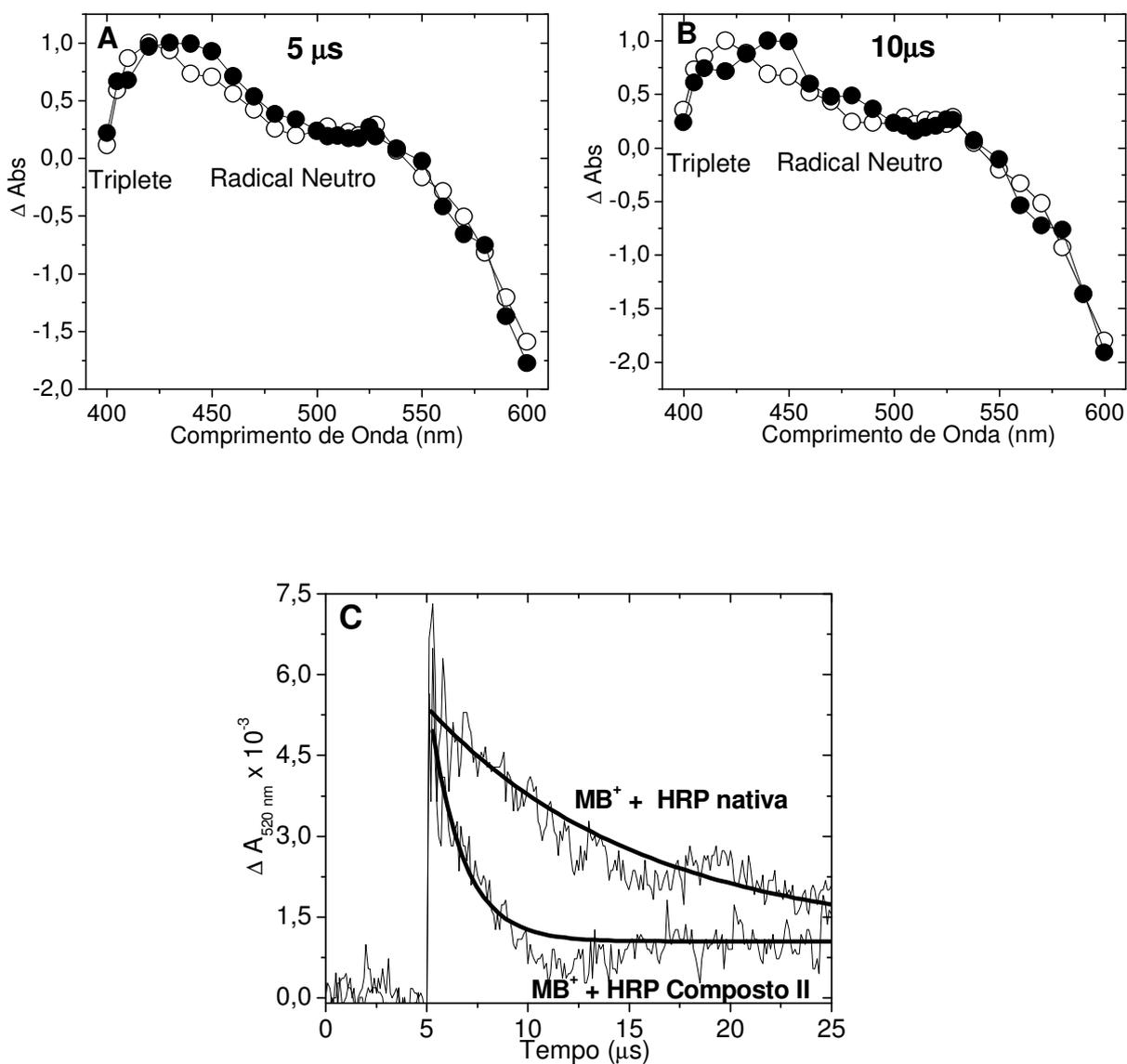


Figura 10. Espectro transiente normalizado ΔA de *flash* fotólise de MB⁺ livre e associado à HRP e o efeito da HRP no tempo de vida do MB⁺. A – Espectro do triplete de 15 μM de MB⁺ obtido 5,0 μs após o pulso de laser na ausência de HRP (círculos brancos) e no mesmo tempo na presença de 5,0 μM de HRP (círculos pretos); B - Espectro de 15 μM de MB⁺ triplete obtido 10,0 μs após o pulso de laser na ausência de HRP (círculos brancos) e no mesmo tempo na presença de 5,0 μM de HRP (círculos pretos). C - Decaimento do sinal de MB⁺ na presença de HRP nativa e na presença de HRP Composto II formada pela adição de peróxido de hidrogênio. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 8,0 e temperatura ambiente.

4.1.5. Caracterização do ferro hemínico e do intermediário oxiferril porfirina π -cátion na presença de MB^+

Com o objetivo de detectar e caracterizar alguma espécie de radical formada, a reação de HRP com H_2O_2 foi acompanhada por EPR com amostras congeladas em um tempo limitado e variada a temperatura como indicado nas Figuras. O espectro de EPR da HRP nativa revela uma região de campo baixo, com a presença de duas espécies alto spin de Fe(III) ($g = 6,0$) com uma simetria quase axial. A proporção entre as espécies de HRP pode ser modulada por variação de força iônica, todavia as condições experimentais foram realizadas de acordo com as utilizadas nos experimentos cinéticos. A adição de peróxido de hidrogênio promove o desaparecimento do sinal $g = 6$ indicando que ambas as conformações de HRP foram convertidas em intermediários de alta valência. Ao mesmo tempo pode ser observado o aparecimento de um sinal largo de EPR na região de alto campo ($g = 2,0$), característico de Composto I, radical oxiferril porfirina π -cátion com acoplamento antiferromagnético entre os elétrons do ferro do grupo heme e o anel porfirínico ($S = 1/2$) (SCHULZ *et al.*, 1984) (Fig. 11A). Como indicado na Fig. 11A no decurso da reação, o sinal $g = 6,0$ do ferro hemínico da HRP foi progressivamente recuperado com o concomitante desaparecimento do sinal $g = 2,0$. Entretanto, o sinal do ferro hemínico da HRP recuperado, revela diferentes proporções de espécies enzimáticas no fim do ciclo catalítico. Esta mudança espectral pode ser resultante da oxidação de um resíduo de aminoácido da HRP, quando na forma de alta valência. Após a adição de peróxido de hidrogênio, a presença de MB^+ pouco altera o espectro de EPR da HRP sugerindo uma simetria local do ferro hemínico. Este resultado é compatível com a ligação entre moléculas de MB^+ e o grupo heme (Fig. 11B). A Figura 11C mostra o espectro de EPR da HRP no curso da reação com

peróxido de hidrogênio, na presença de MB^+ e irradiado, neste sistema, a adição de peróxido de hidrogênio conduz ao rápido desaparecimento do sinal $g = 6,0$ com o concomitante aparecimento do sinal de $g = 2,0$, sendo o ciclo catalítico da enzima, extremamente, mais rápido nesta condição (240 min no escuro e na ausência de MB^+ e 11 min sob irradiação na presença de MB^+). A Figura 11D mostra o efeito das seguintes temperaturas: 4, 8, 10, 13, 20, 30, 40 e 50 K (como indicado pela seta) no sinal $g=2,0$ de EPR. A diminuição do sinal $g = 2,0$ com o aumento da temperatura corrobora que esta espécie paramagnética não é um radical livre, uma vez que a energia de microondas foi mantida constante.

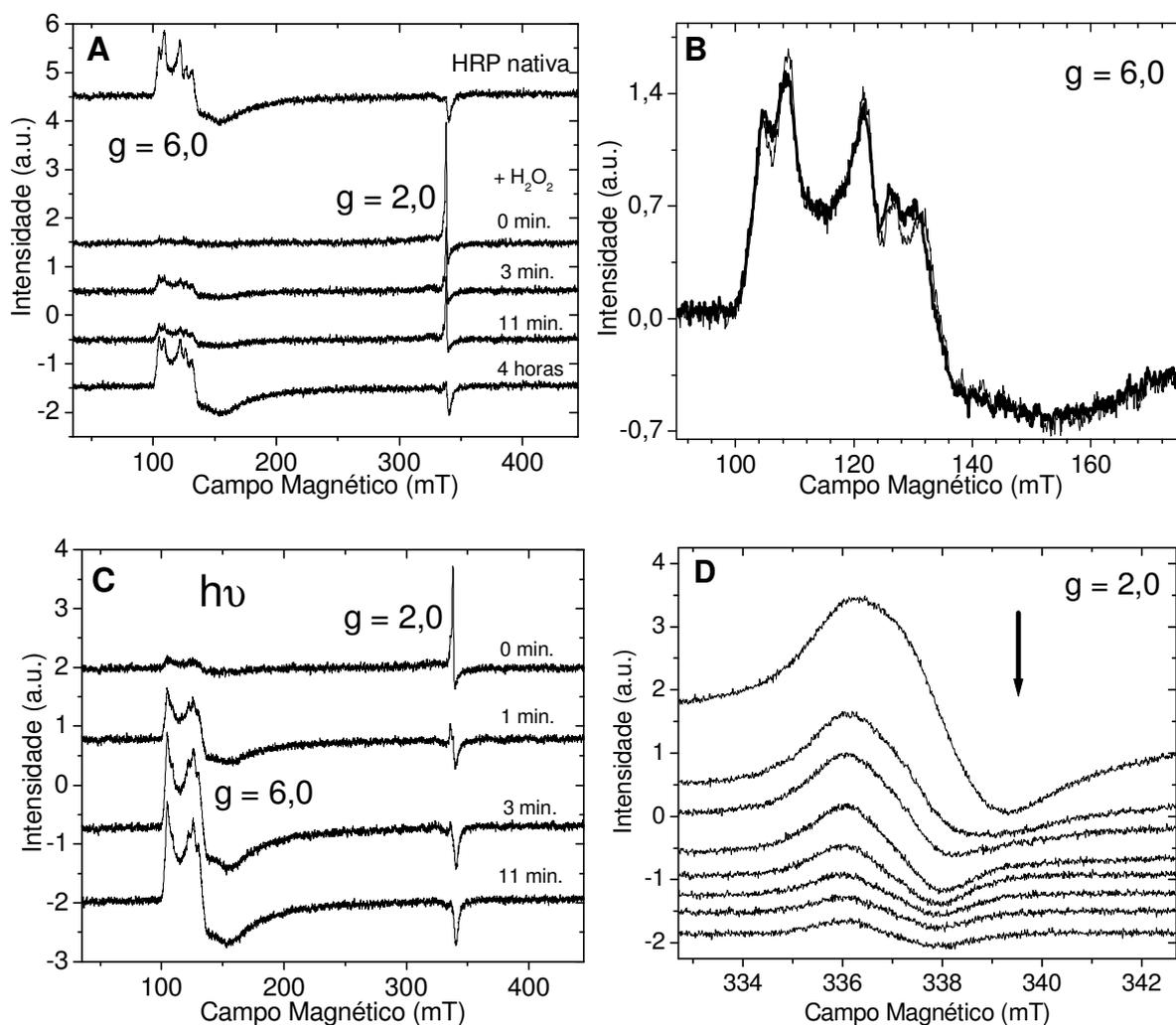


Figura 11. Espectro de EPR. Espectros de 100 μM de HRP obtidos a 11 K em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 8,0 no decorrer da reação com peróxido de hidrogênio. A - Espectro de EPR da HRP obtido antes e 15 s, 3 min, 11 min e 4 h após a adição de peróxido de hidrogênio (conduzido sem irradiação). B - Espectro de EPR, sem irradiação da HRP nativa na ausência (linha fina) e na presença de 100 μM de MB^+ (linha grossa). C - Espectro de EPR da HRP obtidos a 15 s, 3 min, 11 min após a adição de peróxido de hidrogênio na presença de MB^+ irradiado. D - Efeito de temperatura na região do espectro de campo alto. As temperaturas foram: 4, 8, 10, 13, 20, 30, 40 e 50 K como indicado pela seta. Frequência de microondas de 9,44079 GHz, *scanning* do campo magnético de 60 G, campo de modulação de 0,1 G e energia de microondas de 5 mW.

4.1.6. Modelo proposto para associação entre MB⁺ e HRP

Considerando que os dados cinéticos, de *flash* fotólise e de EPR sugerem uma ligação entre MB⁺ e a estrutura da HRP, um modelo do complexo molecular entre MB⁺ e HRP, compatível com os resultados experimentais, foi proposto. A Figura 12 mostra que moléculas de MB⁺ podem se ligar a região do grupo heme da HRP. O modelo molecular aponta a existência de dois potenciais sítios de ligação para o MB⁺ nas imediações do grupo heme (WELINDER, 1979), porém dados cinéticos mostram que a ligação de MB⁺ molecular não é o suficiente para reduzir HRP Composto II. Deste modo, o MB⁺ triplete próximo da HRP poderia abstrair um elétron de um aminoácido ou de outra molécula de MB⁺ via mecanismo colisional. De acordo com o modelo molecular, a fotoconversão de MB⁺ (moléculas do corante azul claro) para MB[•] elimina a interação eletrostática do corante com os aminoácidos de carga negativa (representados por cadeia vermelha), diminuindo a afinidade com a enzima. Nestas condições, a ligação poderia resultar da remanescente interação hidrofóbica entre moléculas do corante e resíduos de aminoácidos, como Phe e Pro (cadeia verde). Tentativas cristalográficas foram realizadas com a finalidade de se obter o cristal do modelo proposto, porém não foi possível, a literatura mostra que cristais de HRP nativa nunca foram obtidos, somente cristais de formas recombinantes da enzima (HENRIKSEN e GAJHEDE, 1995; BERGLUND *et al.*, 2002).

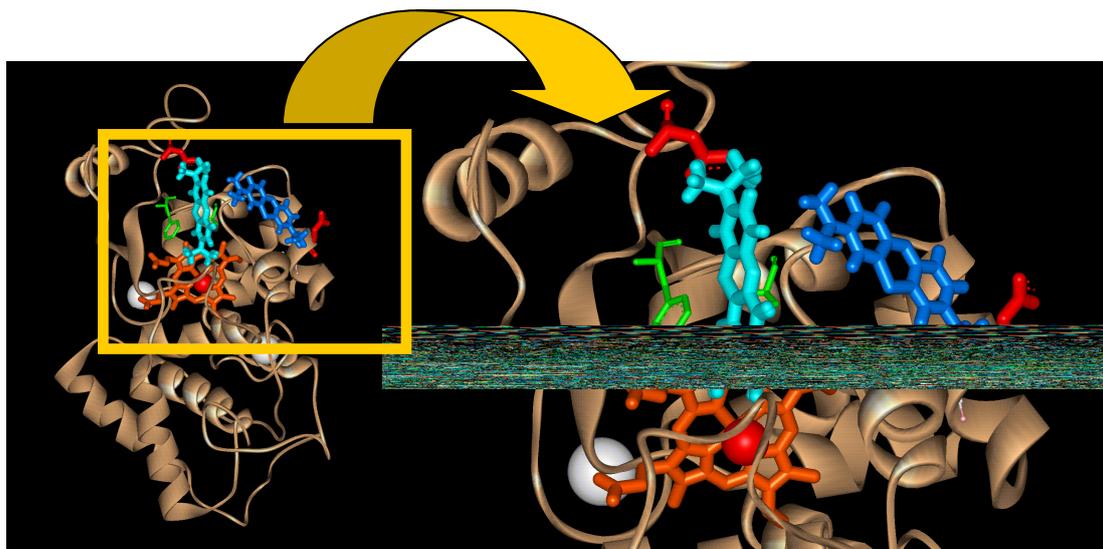
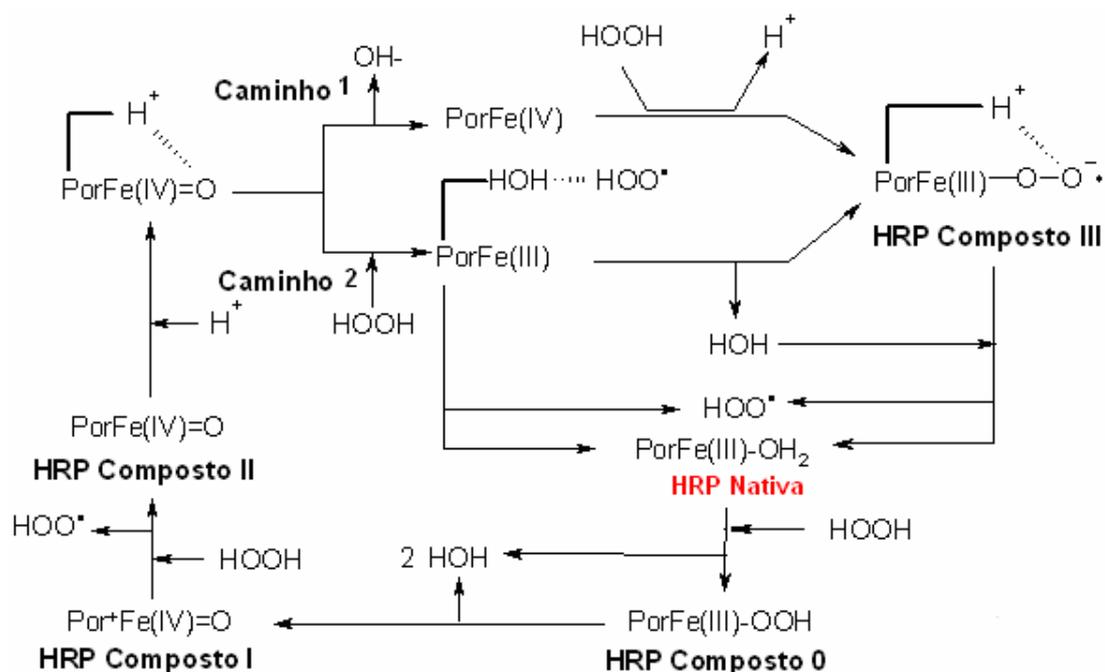


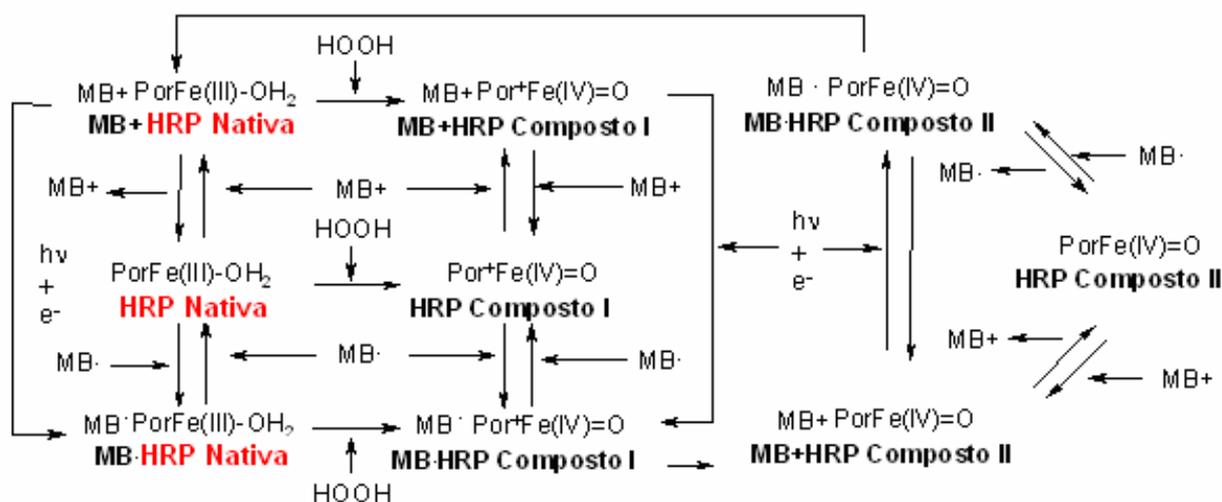
Figura 12. Figura mostrando os possíveis sítios de ligação do corante na estrutura da HRP. O painel da esquerda mostra MB ligado a estrutura da HRP. Os aminoácidos da cadeia lateral não são mostrados claramente. O painel da direita corresponde a um aumento da região do grupo heme da enzima. Em branco está representado um dos cálcios presentes na estrutura da enzima. Os modelos foram gerados por meio do *software* ArgusLab (THOMPSON, 2006).

4.1.7. Mecanismo de Reação

De acordo com os resultados apresentados anteriormente foram propostos os mecanismos para o ciclo catalítico da HRP gerado por peróxido de hidrogênio no escuro e/ou na ausência de MB^+ , e sob irradiação na presença de MB^+ , Esquemas 10 e 11, respectivamente.



Esquema 10. Ciclo catalítico da HRP utilizando HOOH como agente oxidante e redutor.



Esquema 11. Ciclo catalítico da HRP utilizando HOOH como agente oxidante e MB^+ como agente redutor.

No escuro e/ou na ausência do MB^+ , a adição de peróxido de hidrogênio inicia o bem conhecido ciclo catalítico da HRP, sendo este o agente oxidante (formação do Composto I) e o agente redutor (formação do Composto II e regeneração da HRP

nativa). Neste caso, a redução de um elétron do Composto I por HOOH gera $O_2^{\bullet-}$ e Composto II, os quais reagem com outra molécula de HOOH produzindo H_2O e Composto III (oxiperoxidase). A reação de Composto II com peróxido de hidrogênio pode ocorrer por dois caminhos: no primeiro, a reação de ferril peroxidase com peróxido de hidrogênio é precedida pela dissociação do ânion hidroxil. No segundo caminho, peróxido de hidrogênio é oxidado por ferril peroxidase a radical superóxido, o qual reage com peroxidase férrica para formar o Composto III. De qualquer maneira, Composto III decai rapidamente à forma nativa e gera íons superóxidos. A formação do Composto III resulta em uma turbidez da solução na ausência de substratos redutores; e progressiva inativação enzimática, devido ao ataque de íons superóxidos a estrutura da enzima.

A adição de MB^+ em um meio contendo HRP leva a formação de um complexo proteína-corante, sendo que MB^+ pode se ligar à enzima antes ou depois desta ser fotoreduzida. A adição de peróxido de hidrogênio converte a enzima em sua forma livre ou associada ao corante em intermediários de alta valência, Composto I.

Considerando que MB^+ pode ocupar o grupo heme da enzima (Fig. 12), e esse irradiado pode gerar MB^{\bullet} nas proximidades do ferro hemínico. Ele, o MB^{\bullet} se torna, neste caso, o principal agente fotorredutor dos intermediários de alta valência de HRP produzidos pela adição de peróxido de hidrogênio. Deste modo, em amostras irradiadas na presença de MB^+ o ciclo catalítico da enzima HRP é consideravelmente acelerado.

4.2. Parte 2 – Caracterização do Ciclo Catalítico da HRP Utilizando-se as Imidas, DMPN e DPN, Fotoativadas Como Agentes Redutores, na Presença e na Ausência de Micelas de CTAB

4.2.1. Estudo espectral e cinético

A redução dos intermediários de alta valência de HRP pelas imidas fotoativadas, DMPN e DPN foi acompanhada de forma similar à apresentada pelo azul de metileno fotoativado. Como previamente descrito (introdução) a imida DPN possui dois grupos fosfonatos em sua estrutura o que a torna razoavelmente solúvel em água. A imida DMPN, por outro lado, apresenta um substituinte hidrofóbico (grupo dodecil) no lugar de um grupamento fosfato o que confere característica anfifílica a essa molécula. Como esta imida anfifílica apresenta baixa solubilidade ela foi associada a micelas de CTAB, dessa forma, será previamente apresentado o efeito do CTAB sobre o ciclo catalítico da HRP.

As Figuras 13 e 14 representam as mudanças espectrais de HRP na presença de peróxido de hidrogênio (HOOH) em meios heterogêneo (micelas de CTAB em tampão fosfato de sódio pH 6,0) e homogêneo (tampão fosfato de sódio pH 6,0), na ausência de imida. Nas Figuras, 13 e 14, as linhas pretas grossas correspondem ao espectro de HRP em seu estado nativo, obtido anteriormente à adição de peróxido de hidrogênio e as linhas vermelhas, verdes e azuis correspondem aos espectros obtidos 100, 300 e 600 segundos, após a adição do peróxido de hidrogênio na seqüência indicada pela seta. O espectro obtido em 100 s (linha vermelha pontilhada) mostra a maior população de HRP Composto II obtida e os espectros subseqüentes mostram o progressivo retorno à forma nativa (depleção de peróxido de hidrogênio) acompanhado por correspondente desvio hipsocrômico

da banda Soret, o que está de acordo com a literatura (DUNFORD, 1999). A análise desses espectros deixa evidente que em CTAB o retorno à forma nativa da enzima é mais rápido, ou seja, o consumo de peróxido de hidrogênio é favorecido. Já em meio homogêneo, após 600 s, ainda predomina a HRP Composto II, ou seja, o consumo de peróxido de hidrogênio é mais lento, corroborando que o ciclo catalítico da enzima em meio homogêneo está ocorrendo bem mais lentamente do que em meio heterogêneo. Este resultado está plenamente de acordo com modificações na estrutura da enzima, ocasionadas pelo CTAB, que serão apresentadas mais adiante.

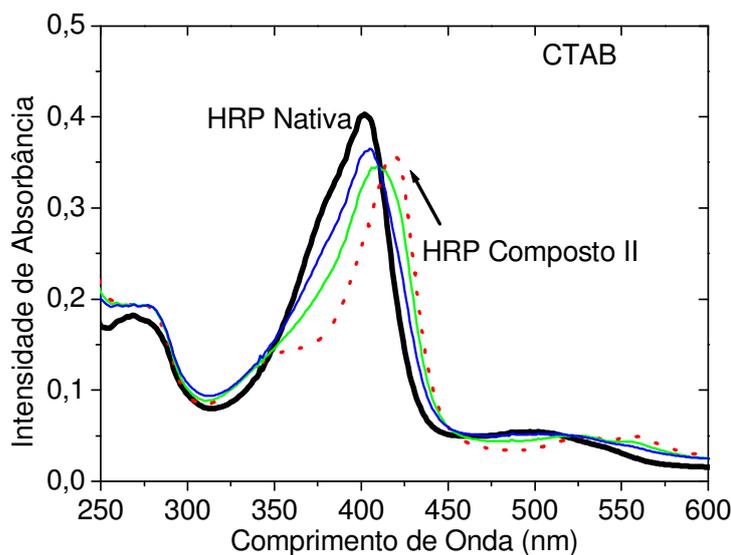


Figura 13. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo de micelas de CTAB. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte. As concentrações de peróxido de hidrogênio e HRP foram 8 μ M e 4 μ M, respectivamente.

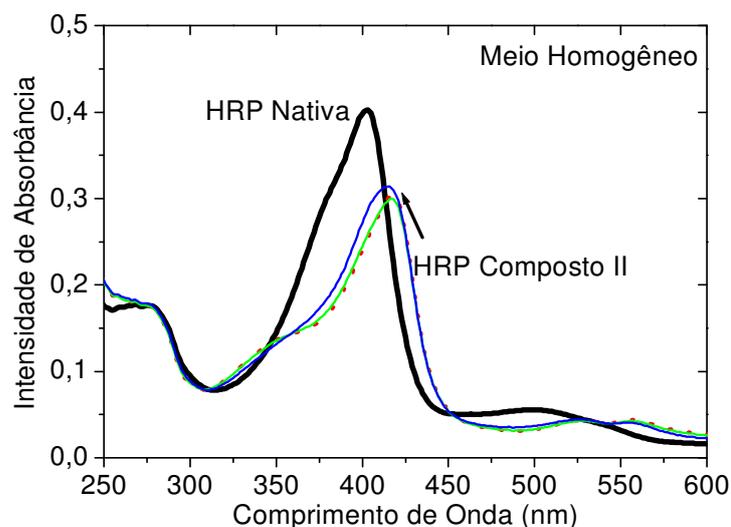


Figura 14. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte. As concentrações de peróxido de hidrogênio e HRP foram 8 μM e 4 μM , respectivamente.

Com a finalidade de se determinar a eficiência das imidas, DMPN e DPN, fotoativadas como agentes redutoras no ciclo catalítico da HRP (depleção de H_2O_2), os estudos apresentados anteriormente foram repetidos com as respectivas imidas. Conforme mostrado na Figura 6 (introdução) as imidas estudadas absorvem na região de 300 a 400 nm, dessa forma, os espectros a seguir são espectros compósitos (HRP e imida).

As Figuras 15 e 16 representam as mudanças espectrais de HRP na presença da imida anfifílica, DMPN, na presença de peróxido de hidrogênio (HOOH) em meios heterogêneo (micelas de CTAB em tampão fosfato de sódio pH 6,0) e homogêneo (tampão fosfato de sódio pH 6,0). Nas Figuras, 15 e 16, as linhas pretas grossas correspondem ao espectro de HRP em seu estado nativo, obtido anteriormente à adição de peróxido de hidrogênio e as linhas vermelhas, verdes e

azuis correspondem aos espectros obtidos 100, 300 e 600 segundos, após a adição do peróxido de hidrogênio na seqüência indicada pela seta e sob irradiação. O espectro obtido em 100 s (linha vermelha pontilhada) é compatível com significativa conversão de HRP nativa ao seu estado de alta valência, Composto II. Os espectros obtidos nos tempos subseqüentes mostram o progressivo retorno à forma nativa acompanhado por correspondente desvio hipsocrômico da banda Soret (depleção de H_2O_2). Comparando-se as Figuras 15 e 16 com 13 e 14, percebemos que a irradiação da amostra acelera o ciclo catalítico da enzima, tanto em meio heterogêneo quanto em quanto em meio homogêneo, provavelmente pelo estado excitado de DMPN ser eficiente redutor dos estados intermediários de alta valência da HRP.

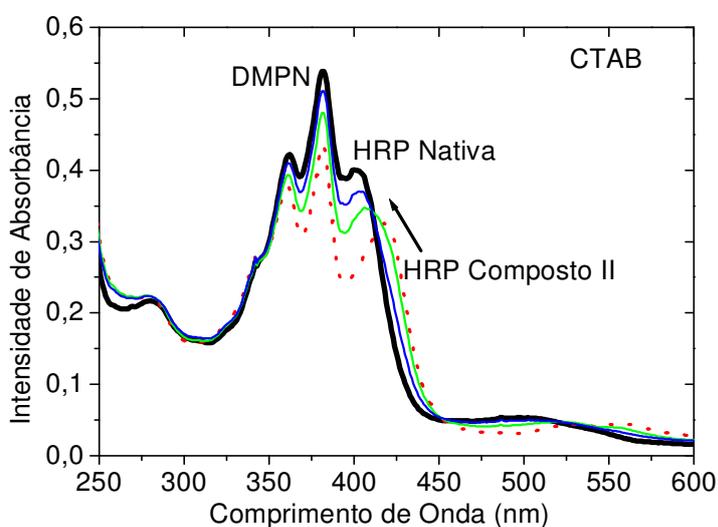


Figura 15. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo, na presença da imida DMPN. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e DMPN foram 8 μ M, 4 μ M e 24 μ M, respectivamente.

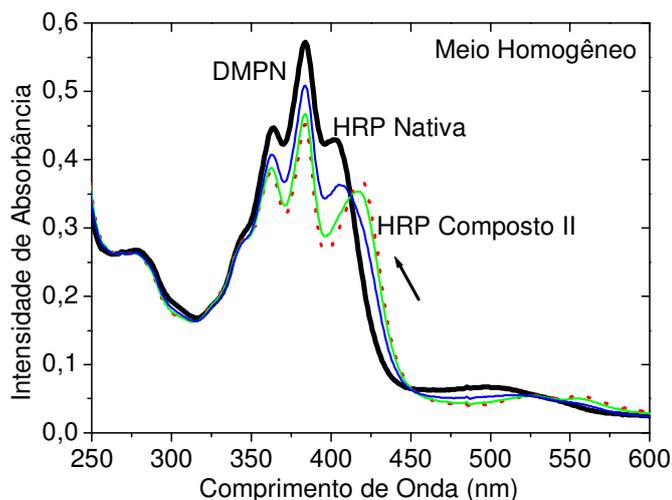


Figura 16. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo, na presença da imida DMPN. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e DMPN foram 8 μ M, 4 μ M e 24 μ M, respectivamente.

O efeito da concentração da imida, DMPN, fotoativada na aceleração do ciclo catalítico da HRP levando a mais rápida depleção de peróxido de hidrogênio em meios heterogêneo e homogêneo é apresentado na Fig. 17. Para esse estudo temporal da regeneração da forma nativa da enzima o espectro da imida pura foi subtraído de cada espectro composto. Esta operação foi possível porque a imida não apresenta nenhuma alteração significativa espectral sob irradiação, na presença e na ausência de HRP. A Fig. 17 mostra que a mudança temporal na intensidade de absorbância em 403 nm (retorno à forma nativa) é influenciada qualitativamente e quantitativamente pela imida anfífilica em ambos os meios. Em micelas de CTAB, quantidades subestequiométrica e estequiométrica de DMPN aceleram o retorno de HRP à forma nativa, sem afetar significativamente o *lag time* de 100 segundos observado na ausência de imida. Acima de 4 μ M de imida verificamos duas

mudanças importantes na cinética de retorno de HRP Composto II à forma nativa: o aumento de concentração de imida não mais afeta a velocidade de retorno e desaparece o *lag time* para o início da volta. Estes resultados nos levam a propor o seguinte modelo: em concentrações subestequiométricas o aumento da concentração de imida apenas aumenta a probabilidade de colisão entre o fotorredutor e a enzima. Acima de 4 μM de imida, deve surgir uma interação permanente da imida com a enzima, tornando-se a primeira uma espécie de grupo prostético adicional da enzima, que passa assim a atuar como um outro catalisador. O *lag time* apresentado na Figura 17 reflete a presença de peróxido de hidrogênio no meio reacional, quando este é depletado o *lag time* desaparece e a enzima retorna à sua forma nativa.

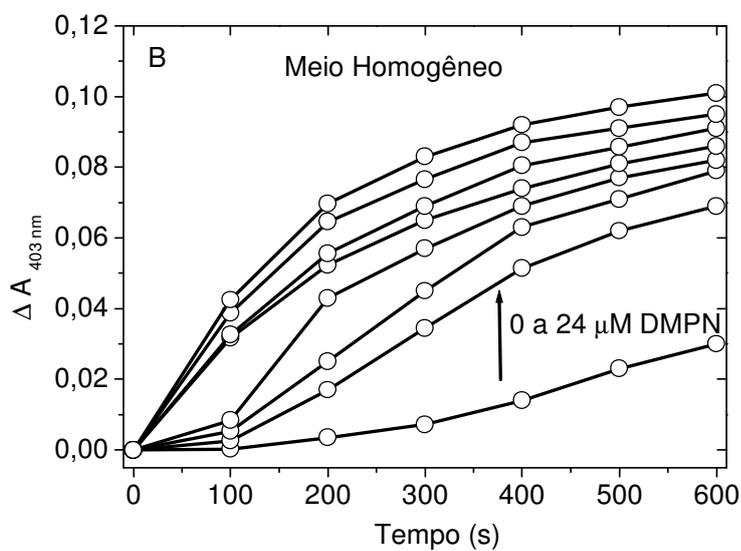
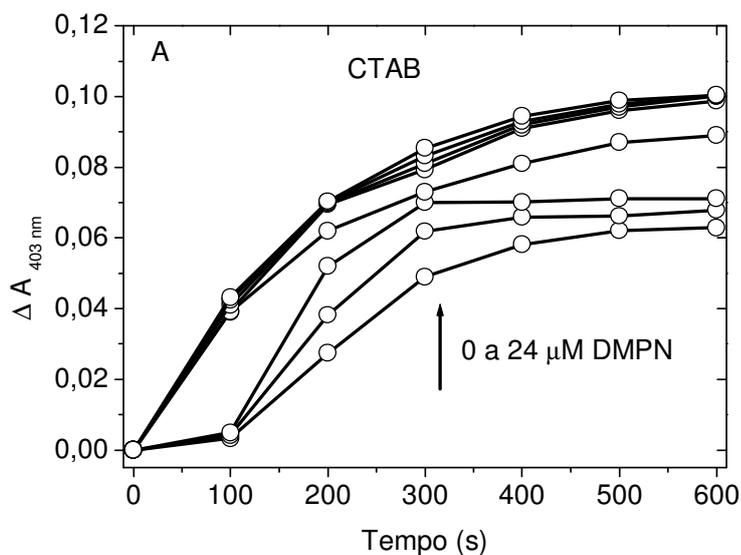


Figura 17. Efeito da concentração de DMPN na redução dos intermediários de alta valência no ciclo catalítico da HRP. A) Meio heterogêneo. B) Meio homogêneo. A seta representa quantidades crescentes da imida: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 μM de DMPN. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36°C, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio e HRP foram 8 μM , 4 μM , respectivamente.

Para um melhor entendimento do processo de redução dos intermediários de alta valência no ciclo catalítico da HRP com a imida, DMPN, fotoativada foi calculada a área gerada abaixo da curva para cada concentração de imida (Figura 18). Esta área é proporcional à velocidade de regeneração de HRP nativa e a depleção do peróxido de hidrogênio. Os círculos pretos representam a imida DMPN fotoativada em meio heterogêneo. Os círculos brancos representam a imida DMPN fotoativada em meio homogêneo. Os triângulos representam o controle realizado com a imida DMPN em meio homogêneo, nas concentrações de 2 e 24 μM , no escuro. Essa Figura mostra que mesmo em concentrações subestequiométrica (2 μM) a imida DMPN favorece a catálise, devido à transferência de elétron fotoinduzida da imida para HRP Composto II. Ao associar a imida DMPN com CTAB a catálise é favorecida ainda mais, pois o CTAB promove uma mudança estrutural na enzima favorável a esse processo (PRIETO *et al.*, 2007). Na estrutura do DMPN, um dos grupos fosfonatos foi substituído por uma cauda hidrofóbica de tal modo que foi diminuída a parte responsável pela repulsão, que ocorre com a imida DPN (mostrada posteriormente), e associada uma parte estrutural hidrofóbica a qual provavelmente permite associação do substrato com um sítio da enzima. Devido sua estrutura, DMPN poderia ter sido eficiente como fotorredutor por promover mudanças estruturais na HRP. Contudo, os experimentos realizados com a imida DMPN no escuro, em meio homogêneo, comprovam que, diferente do CTAB, a imida anfifílica não favoreceu a regeneração da forma nativa da enzima. Conforme será mostrado mais adiante, o DMPN, similarmente ao CTAB, promove mudanças estruturais na HRP. A causa dessas mudanças não aumentarem a atividade da HRP com peróxido de hidrogênio, pode ser pelo fato de serem inócuas para tal, ou pelo

fato do DMPN ocupar o sítio ativo da enzima na forma de HRP Composto II e desfavorecer a regeneração da forma nativa da enzima.

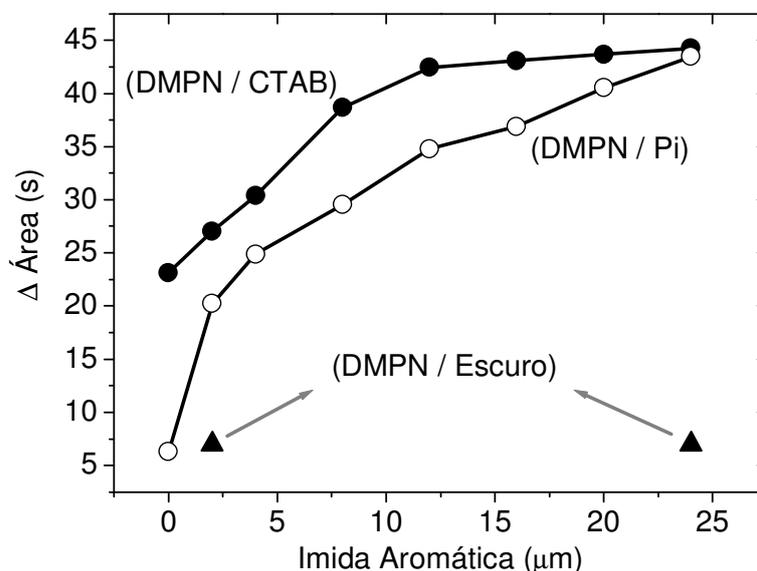


Figura 18. Curva de formação de HRP nativa a partir de HRP Composto II em função da concentração de imidas. Os círculos pretos (●) representam a imida DMPN fotoativada em meio heterogêneo. Os círculos brancos (○) representam a imida DMPN fotoativada em meio homogêneo. Os triângulos (▲) representam o controle realizado com a imida DMPN em meio homogêneo, nas concentrações de 2 e 24 μM, no escuro. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte. As concentrações de HRP e peróxido de hidrogênio foram de 4 μM e 8 μM, respectivamente.

As mudanças espectrais de HRP na presença da imida não anfifílica, DPN, na presença de peróxido de hidrogênio (HOOH) em meios heterogêneo (micelas de CTAB em tampão fosfato de sódio pH 6,0) e homogêneo (tampão fosfato de sódio pH 6,0) foram também investigadas. Nas Figuras, 19 e 20, as linhas pretas grossas correspondem ao espectro de HRP em seu estado nativo, obtido anteriormente à adição de peróxido de hidrogênio e as linhas vermelhas, verdes e azuis correspondem aos espectros obtidos 100, 300 e 600 segundos, após a adição do peróxido de hidrogênio na seqüência indicada pela seta e sob irradiação. Analisando

essas Figuras notamos que durante o ciclo catalítico da enzima, a banda Soret do espectro da HRP é deslocada de 403 nm (HRP nativa) para 418 nm (HRP Composto II), não retornando à condição inicial, ou seja, o consumo de peróxido de hidrogênio é desfavorecido. Comparando-se as Figuras 19 e 20 com 13 e 14, percebemos que a imida DPN fotoativada não é eficiente fotorredutora dos compostos de alta valência da HRP em meios heterogêneo e homogêneo.

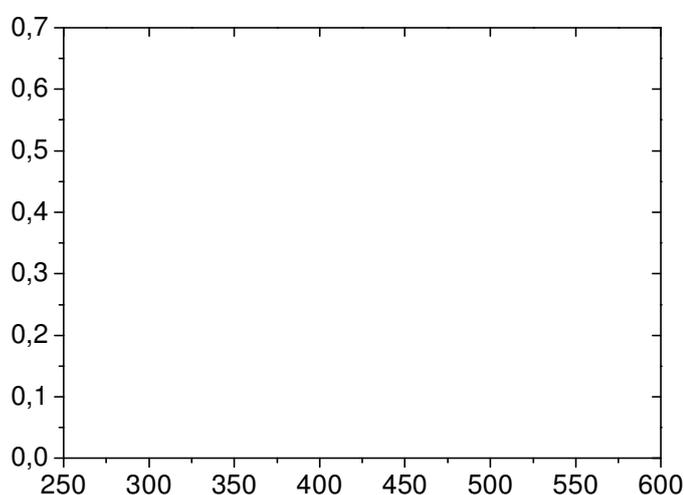


Figura 19. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio heterogêneo, na presença da imida DPN. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e DMPN foram 8 μ M, 4 μ M e 24 μ M, respectivamente.

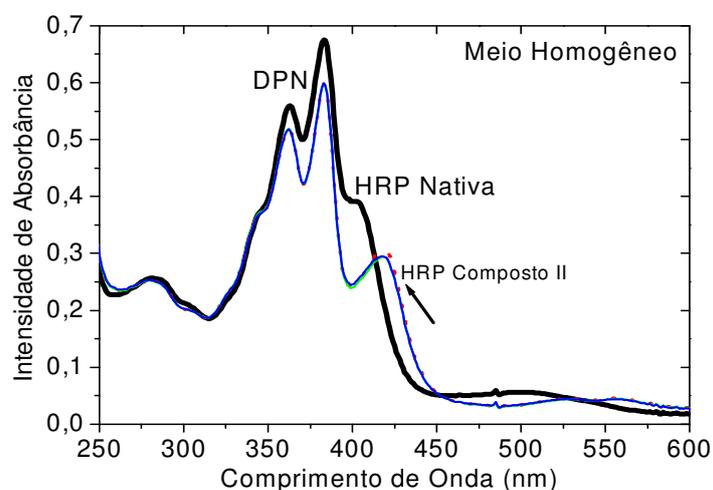


Figura 20. Acompanhamento da banda Soret do espectro UV-visível de HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio em meio homogêneo, na presença da imida DPN. A linha grossa representa a HRP em seu estado nativo (tempo zero). A linha vermelha pontilhada representa HRP Composto II (100 s). A linha verde e azul representa a reação em 300 e 600 s, respectivamente, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP e DPN foram 8 μ M, 4 μ M e 24 μ M, respectivamente.

O efeito da concentração da imida DPN, sobre o ciclo catalítico da HRP foi acompanhado pelo deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$. A Figura 21, também, deixa claro que a imida DPN não contribui quimicamente para a redução dos intermediários de alta valência da enzima. A imida DPN possui dois grupos fosfonatos, os quais, por serem carregados negativamente, devem ser repelidos pela forma ácida da enzima, além do que, competem com a mesma superfície catiônica do CTAB, que favorece a atividade da HRP. Portanto o efeito da imida DPN é somente físico, nota-se em meio heterogêneo (Fig. 21B), que quantidades crescentes da imida deslocam a HRP da micela diminuindo a regeneração da forma nativa da enzima.

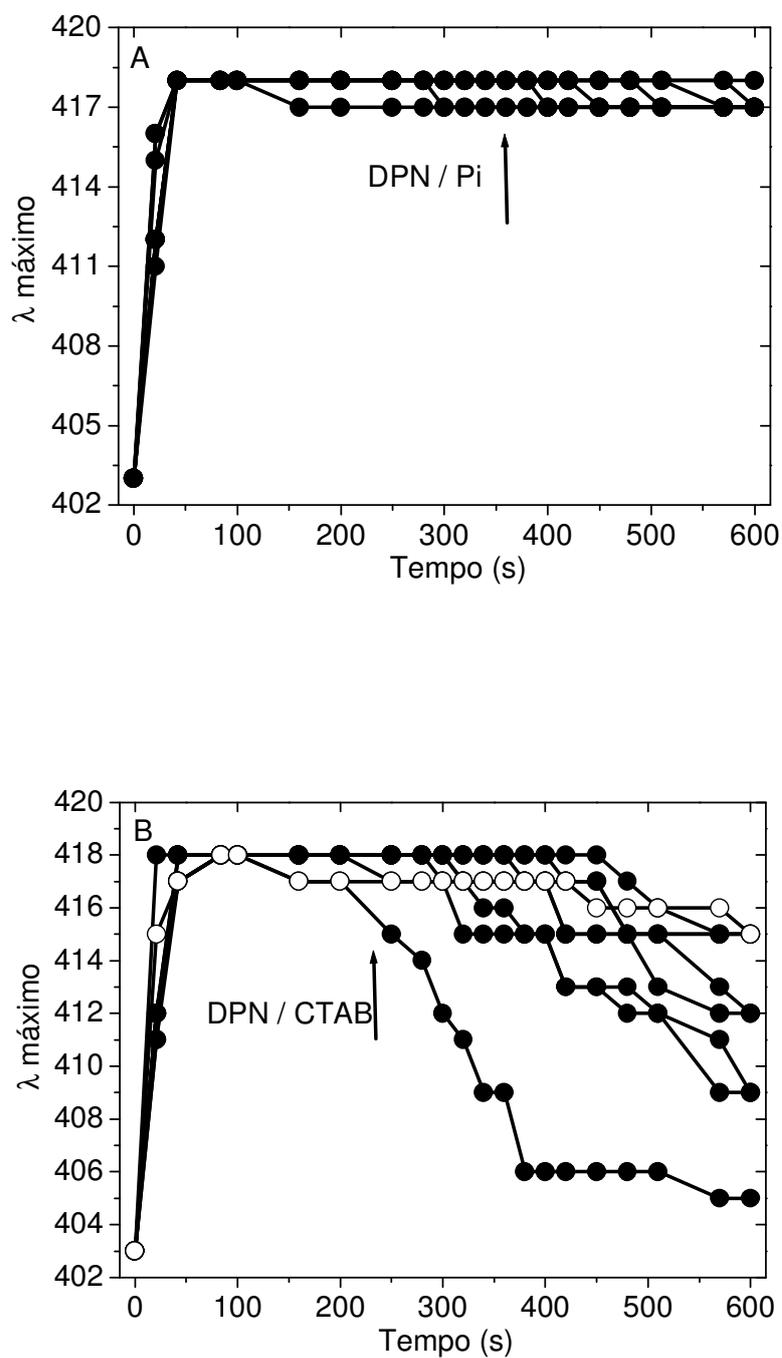


Figura 21. Efeito da concentração de DPN na redução dos intermediários de alta valência no ciclo catalítico da HRP. A) Meio homogêneo. B) Meio heterogêneo, os círculos brancos representam a reação em meio homogêneo sem imida. A seta representa quantidades crescentes da imida: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 μM de DPN. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera inerte, irradiada. As concentrações de peróxido de hidrogênio, HRP foram 8 μM , 4 μM , respectivamente.

Para testarmos se a capacidade catalítica da HRP seria modificada na presença da imida DMPN, foi monitorado em meio homogêneo a oxidação do guaiacol, substrato clássico para HRP. Conforme podemos observar na Fig. 22 o espectro de absorção tanto na ausência (Fig. 22A) quanto na presença da imida (Fig. 22B) apresentam similaridades na região de 470 nm, característica do produto formado, ou seja, guaiacol oxidado. Este resultado deixa claro que a imida DMPN não está ocupando o sítio de ligação do guaiacol.

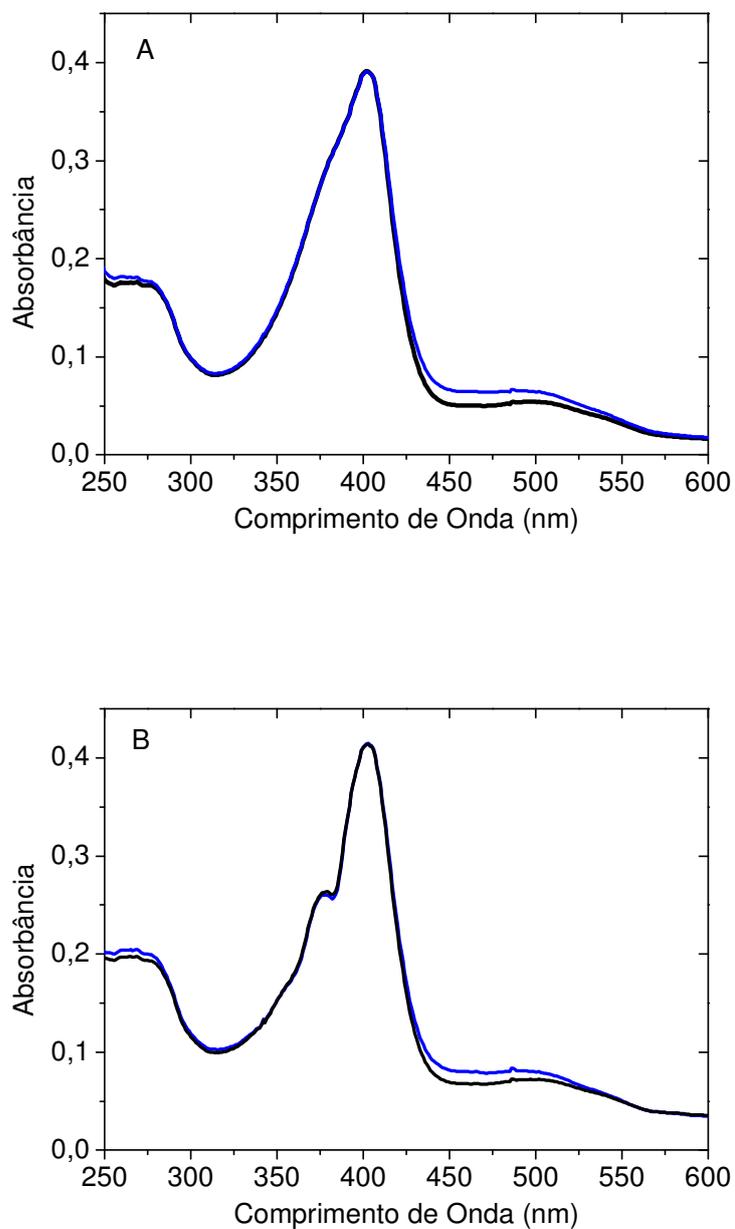


Figura 22. Espectro de absorção no tempo inicial (linha preta) e final (linha azul) da oxidação do guaiacol pela HRP Composto II. A) Na ausência da imida DMPN. B) Na presença da imida DMPN. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C, em atmosfera inerte. As concentrações de HRP, peróxido de hidrogênio, guaiacol e DMPN foram 4 μ M, 8 μ M, 24 μ M, 4 μ M respectivamente.

4.2.2. Estudo Estrutural

Como mostrado anteriormente o ciclo catalítico da HRP é acelerado na presença de micelas de CTAB, dessa maneira investigamos as alterações que esse surfactante promove na estrutura da enzima. A Fig. 23 mostra o efeito da concentração de CTAB na fluorescência do Trp 117. Este aminoácido está localizado próximo ao bolsão do heme (WELINDER, 1979), assim mudança em sua fluorescência é um indicativo do que está ocorrendo em sua vizinhança. Essa Figura mostra que o aumento na concentração de CTAB desloca a banda de fluorescência do Trp 117 para o vermelho e aumenta sua intensidade de fluorescência. O *turning point* em torno de 0,5 mM corresponde a CMC desse surfactante na presença de HRP, a literatura mostra um valor de 0,9 mM para o CTAB em água (FENDLER, 1982), mas este valor é menor na presença de tampões. Acima de 20 mM de CTAB um novo incremento na fluorescência é observado. O inserto mostra que em altas concentrações de CTAB o deslocamento batocrômico do $\lambda_{\text{máx}}$ não é acompanhado do aumento na intensidade de fluorescência. Em altas concentrações as micelas de CTAB sofrem alterações conformacionais com uma disposição hexagonal (“*worm-like*”) (DAVIES *et al.*, 2006) e provavelmente essa mudança ocasiona mudanças na fluorescência da HRP nessas condições.

As alterações conformacionais na HRP induzidas pelo CTAB foram também investigadas por dicroísmo circular (CD). A Figura 24 mostra o espectro de CD da HRP nativa em meio homogêneo e na presença de micelas de CTAB na região UV (240-320nm). Nessa região o espectro de CD de proteína reflete principalmente a contribuição de aminoácidos aromáticos e de pontes dissulfeto da estrutura terciária da proteína e é muito sensível a mudança estrutural. O espectro *near-UV* de CD da

HRP é caracterizado por uma banda negativa centrada em 284 nm, a qual é atribuída à presença de Trp e Tyr. A presença de CTAB promoveu um aumento de intensidade dessa banda em 284 nm quando comparada com a banda obtida em meio homogêneo.

Os resultados de fluorescência e CD sugerem associação da HRP com as micelas de CTAB, esta associação promove uma alteração na estrutura terciária da enzima promovendo o empacotamento dos aminoácidos aromáticos. Resultados similares foram obtidos por MOGHARRAB *et al.*, 2007 utilizando o ácido 2 carboxílico antraquinona como modificador químico de HRP, onde o empacotamento dos aminoácidos induzido quimicamente promoveu o aumento da eficiência catalítica.

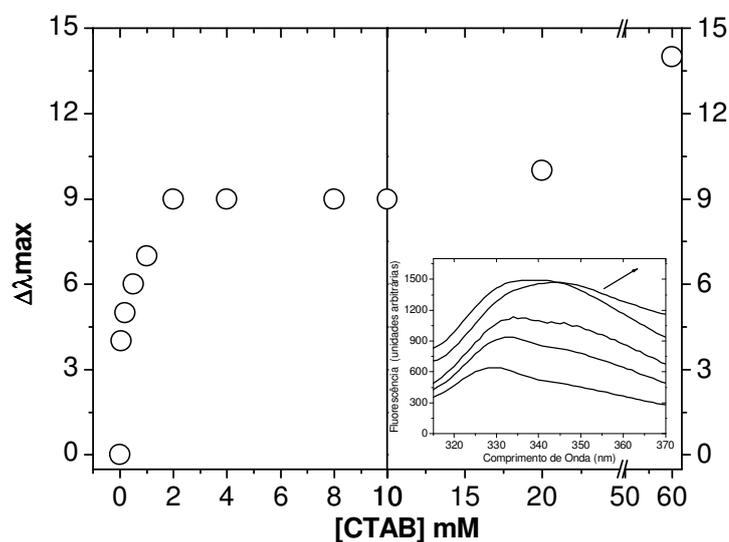


Figura 23. $\Delta \lambda_{\text{máx}}$ do Trp da HRP na presença de diferentes concentrações de CTAB. O inserto representa o espectro de fluorescência obtido nas seguintes concentrações de CTAB: 0, 0,5, 2,0, 20 e 60 mM, como indicado pela seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C. A concentração de HRP foi de 2 μM .

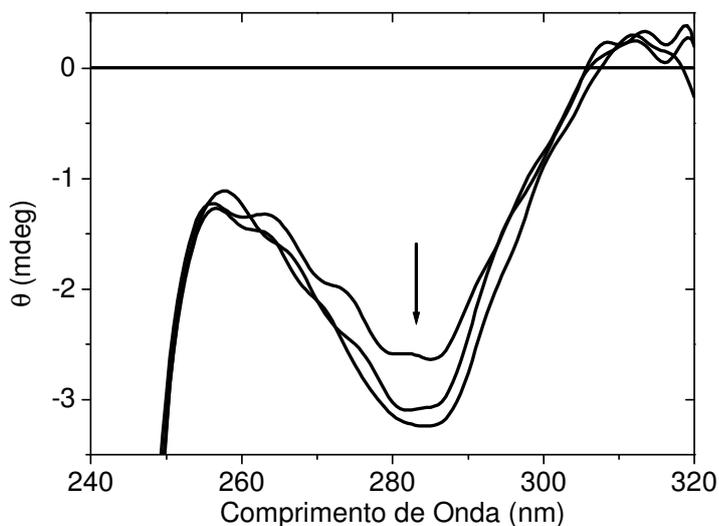


Figura 24. Espectro de CD *near-UV* da HRP na ausência de CTAB, na presença de 20 e 60 mM de CTAB, de acordo com a seta. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C. A concentração de HRP foi de 70 μ M.

Os resultados cinéticos apresentados anteriormente mostram que, na presença de micelas de CTAB, a imida DPN retarda a redução de HRP Composto II à forma nativa, sendo inócua em meio homogêneo. Conforme comentado anteriormente, existe a possibilidade de que este desfavorecimento da reação deva-se a uma competição entre a imida duplamente carregada negativamente e a HRP pela ligação à superfície da micela catiônica de CTAB que favorece a atividade catalítica da HRP. Com a finalidade de corroborar que de fato existe uma interação entre a imida e a micela foi realizado um estudo fluorimétrico de DPN em meio heterogêneo de micelas de CTAB (Figura 25). Nesta Figura observamos uma significativa mudança na razão entre as bandas de 348 nm e 412 nm da imida que acompanha o aumento da concentração de imida. Este resultado sugere a formação de diferentes estados de agregação da imida na presença de CTAB (AGARWALL e BORISSEVITCH, 2006; PARKASH *et al.*, 2008). A Figura 26 mostra a razão entre as bandas de fluorescência da imida DPN em 348 / 412, percebemos que quantidades

crecentes da imida interferem na razão dessas bandas. De fato, esse resultado nos sugere que a porção hidrofóbica da imida DPN provavelmente fica inserida no centro hidrofóbico da micela, porém, os grupos fosfonatos permanecem na superfície, convertendo, pelo menos partes das superfícies catiônicas em aniônicas. Como o pH no qual fizemos nossos experimentos está acima do pI (ponto isoelétrico) da isoenzima predominante de HRP, deve haver perda significativa de afinidade da enzima pela micela de CTAB na presença de DPN.

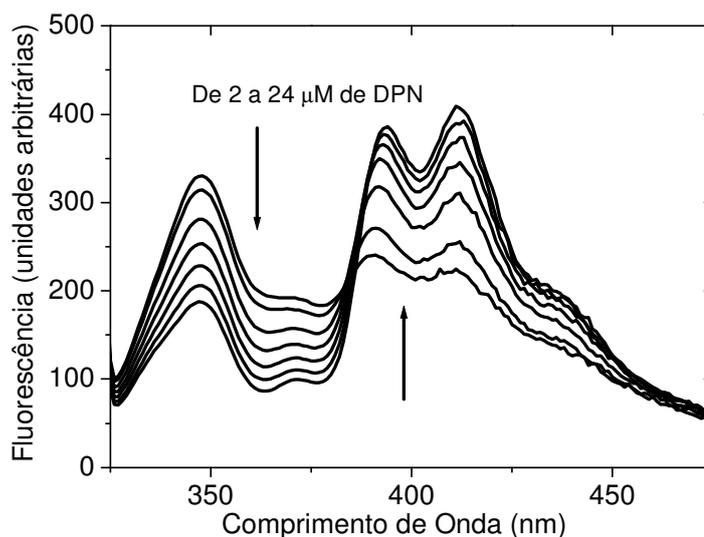


Figura 25. Espectro de fluorescência da imida DPN na presença de CTAB. A seta indica quantidades crescentes de DPN (2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 μM). A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36 °C.

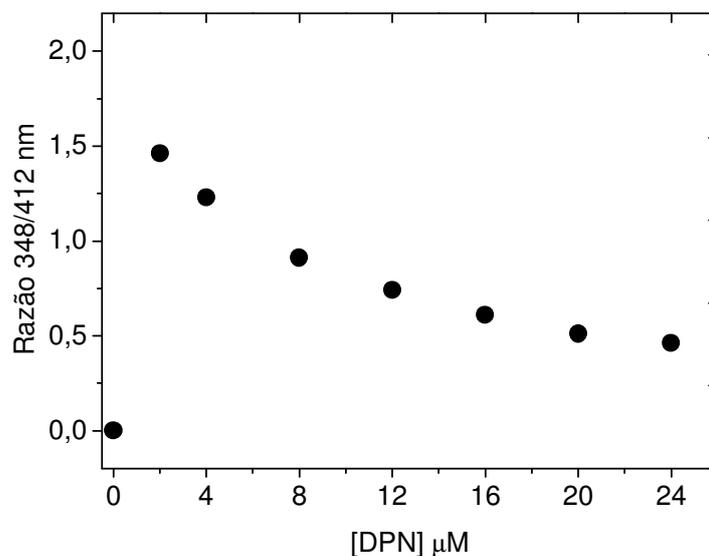


Figura 26. Razão entre as bandas de fluorescência obtida em função da concentração de DPN em presença de CTAB. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, CTAB 20 mM, pH 6,0 a 36°C.

Para corroborar definitivamente a interação da imida não anfifílica com a micela de CTAB, partimos de uma concentração fixa da mesma a qual titulamos com CTAB numa faixa que se esperava abaixo e acima da CMC do detergente. A Figura 27 mostra que, compatível com uma interação com o detergente catiônico, ocorre uma decréscimo de fluorescência da imida DPN na presença de quantidades crescentes de CTAB. Pode-se observar que a primeira adição de CTAB já leva a um significativo decréscimo da intensidade de fluorescência da imida DPN. Adições subseqüentes promovem uma drástica queda na fluorescência que finalmente se estabiliza em torno de 1 mM de CTAB com um *turning point* ao redor de 0,37 mM que corresponde à CMC do CTAB nessa condição experimental, a literatura mostra a CMC de 0,25 mM em pH 4 (FURTADO, 2005). Portanto esses resultados sugerem que há interação da imida com os diferentes estados de agregação do CTAB, ou seja, de monômeros à micelas. Cabe ressaltar que esse experimento nos garante

que as medidas cinéticas, em meio heterogêneo, foram realizadas com o CTAB na forma de micelas.

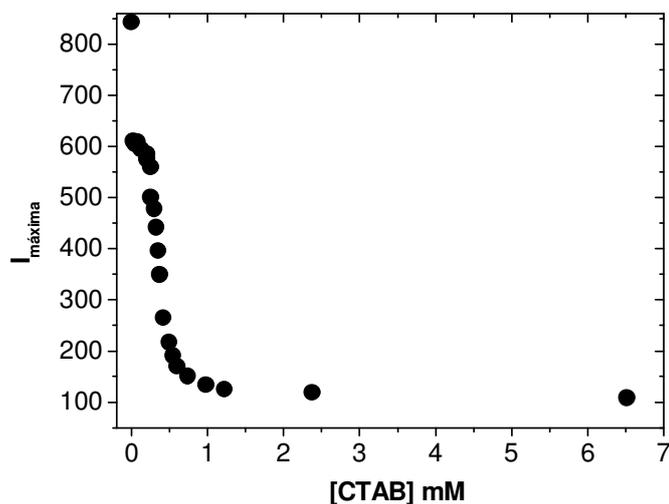


Figura 27. Efeito do CTAB na fluorescência máxima da imida DPN ($\lambda = 383$ nm). A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36 °C. A concentração de imida foi de 24 μ M.

Estudos fluorimétricos foram também efetuados para uma melhor análise da interação da imida anfifílica com a HRP. O efeito imida anfifílica, DMPN, fotoativada foi investigado, uma vez que, na Figura 18 (previamente apresentada), há uma diferença na velocidade de redução dos intermediários de alta valência de HRP em meio homogêneo. A Figura 28 mostra o espectro de fluorescência normalizado do triptofano da HRP em função da concentração da imida DMPN em meio homogêneo. Podemos notar que há um deslocamento da banda de fluorescência para o azul (Figura 29) sugerindo que a imida ao interagir com a enzima desloca o triptofano para uma região mais hidrofóbica. Esse deslocamento pode fazer parte da mudança estrutural que favorece a catálise.

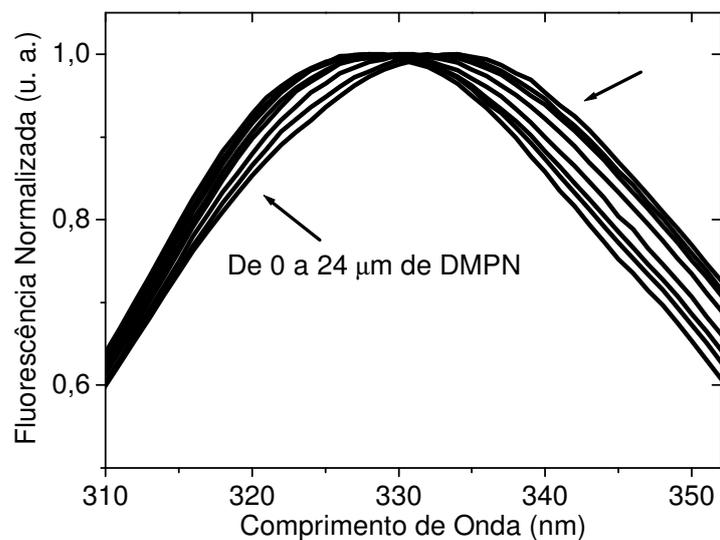


Figura 28. Espectro de fluorescência do triptofano da HRP na presença imida DMPN, normalizado pela intensidade máxima. A seta indica quantidades crescentes de DMPN (0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 μM). A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36°C.

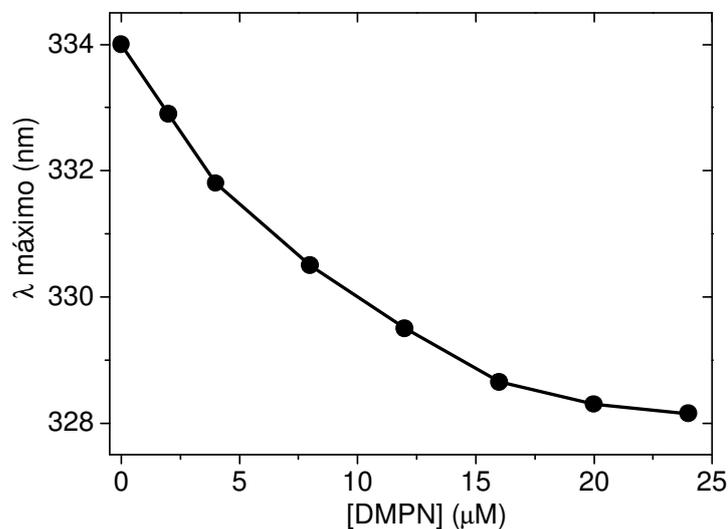
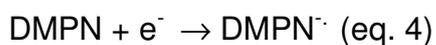


Figura 29. Variação do λ máximo do espectro de fluorescência do triptofano da HRP em função da concentração da imida anfifílica, DMPN. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 a 36°C.

4.2.3. Processo de Transferência de Elétrons entre a Imida e a Enzima

Para um melhor entendimento do comportamento do processo de transferência de elétrons entre a imida e a enzima foi realizada a redução de HRP nativa e HRP Composto II, utilizando o ânion radical de DMPN gerado quimicamente por ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) em atmosfera inerte. Na Figura 30 são apresentados os espectros da imida DMPN em seu estado fundamental, e na forma de ânion radical. A formação de radical livre faz com que a imida absorva em comprimentos de onda mais longos do que as moléculas não reduzidas. A redução ocorre como na equação 4, o ditionito (doador) doa um elétron para imida (aceptor) e esta é reduzida a $\text{DMPN}^{\cdot-}$ (ânion radical).



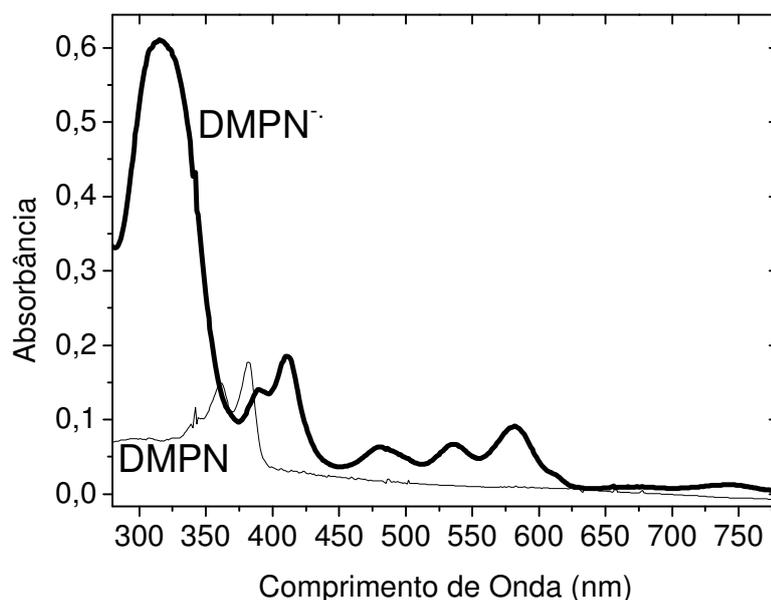


Figura 30. Espectro de formação do ânion radical de DMPN gerado quimicamente. A linha fina representa a imida DMPN no estado fundamental, 25 μM . A linha grossa representa o ânion radical formado após a adição de 25 μL de solução de ditonito de sódio 1,0 mM).

A análise dos resultados da reação entre o ânion radical gerado quimicamente e a enzima em sua forma nativa (Fe^{+3}) evidencia a formação de HRP- Fe^{+2} . A Figura 31 mostra o deslocamento do espectro para o vermelho na região de 430 nm. O inserto representa a cinética de formação de HRP- Fe^{+2} em 438 nm. A depleção da forma HRP- Fe^{+2} e sua regeneração à forma nativa podem ser observadas na Figura 32, nota-se, através do inserto, que este fenômeno ocorreu em um tempo muito maior (3000 s) do que a formação de HRP- Fe^{+2} (10s), provavelmente devido à entrada lenta de oxigênio no meio reacional.

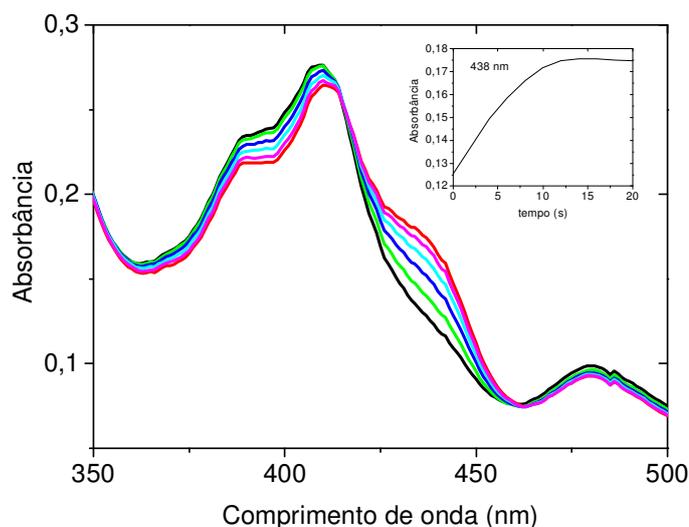


Figura 31. Espectro de formação de HRP – Fe^{2+} , após a formação do ânion radical de DMPN gerado quimicamente. A linha preta representa a adição de HRP nativa no tempo zero. As linhas verde, azul, ciano, rosa e vermelho, representam à formação de HRP – Fe^{2+} nos tempos 2, 4, 6, 8, e 10 s, respectivamente. O inserto mostra a cinética de absorvância em 438 nm em função do tempo. As concentrações de HRP e DMPN foram de 2 μM e 24 μM , respectivamente.

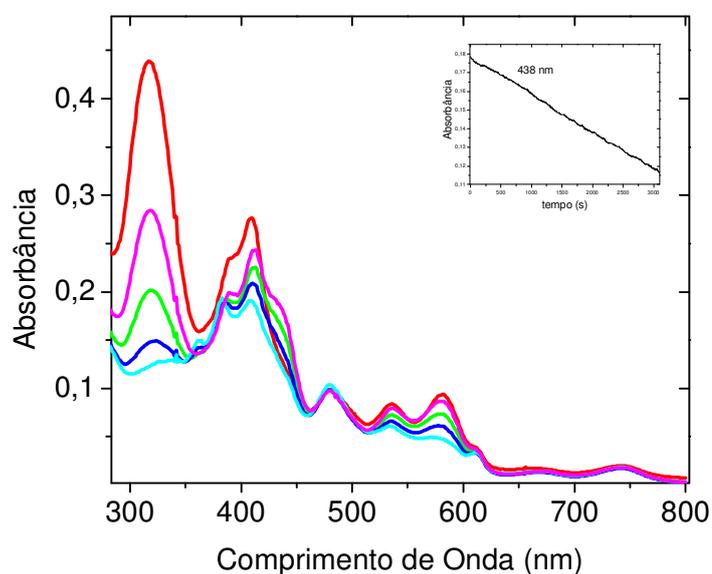


Figura 32. Espectro de regeneração de HRP nativa a partir de HRP – Fe^{2+} e decaimento do ânion radical de DMPN gerado quimicamente. A linha vermelha representa a HRP nativa no tempo zero. As linhas Rosa, verde, azul e ciano, representam à formação a regeneração de HRP nativa a partir de HRP – Fe^{2+} , nos tempos 500, 1000, 2000, e 3000 s, respectivamente. O inserto mostra a cinética de absorvância em 438 nm em função do tempo. As concentrações de HRP e DMPN foram de 2 μM e 24 μM , respectivamente.

Na Figura 33, após a formação do ânion radical gerado quimicamente (linha vermelha), adicionou-se a enzima em sua forma de alta valência (HRP Composto II). Como esperado (Figueiredo *et al.*, 2005), o ânion radical gerado quimicamente foi consumido e a enzima reduzida à sua forma nativa. A equação 5 representa o processo.

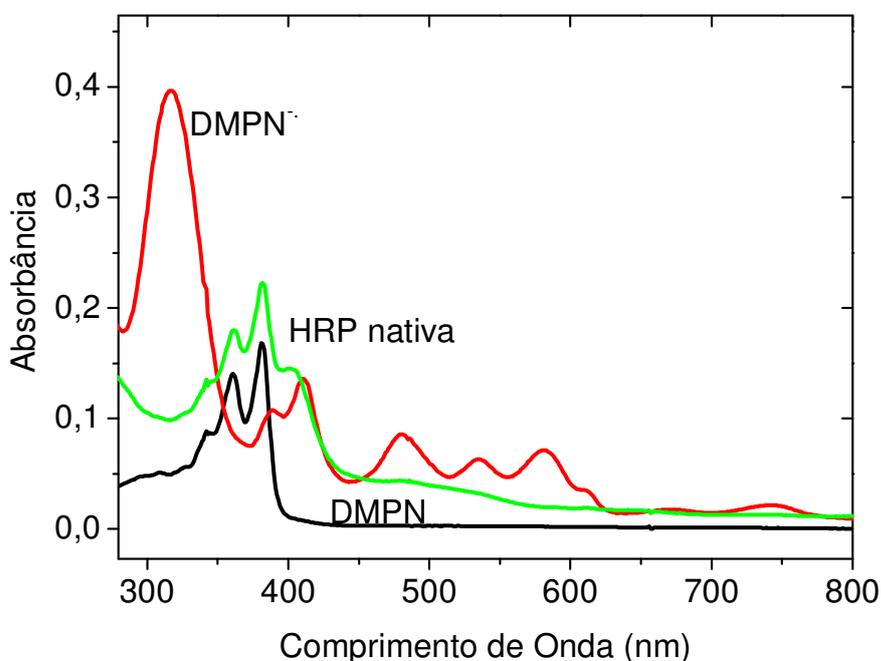
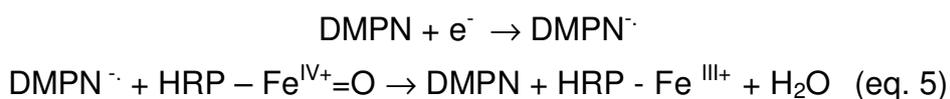


Figura 33. Espectro do decaimento do ânion radical gerado quimicamente na presença de HRP Composto II. A linha preta representa DMPN, 25 μM no estado fundamental. A linha vermelha representa o ânion radical formado após a adição de 25 μL de solução de ditonito de sódio 1,0 mM). A linha verde representa a adição de HRP Composto II 2,0 μM .

4.2.4. Caracterização do ferro hemínico e do intermediário oxiferril porfirina π -cátion na presença das imidas

Com o objetivo de detectar e caracterizar espécies de radical formada, a reação de HRP com H_2O_2 , na presença e na ausência de imida, em meio homogêneo e heterogêneo, foi acompanhada por EPR com amostras congeladas em um tempo limitado como indicado nas Figuras (34, 35 e 36). O espectro de EPR da HRP nativa revela uma região de campo baixo, com a presença de duas espécies alto spin de Fe(III) ($g = 6,0$) com uma simetria quase axial (SOARES *et al.*, 2007). A adição de peróxido de hidrogênio promove o desaparecimento do sinal $g = 6,0$, indicando que ambas conformações de HRP foram convertidas em intermediários de alta valência. Ao mesmo tempo pode ser observado o aparecimento de um sinal largo de EPR na região de alto campo ($g = 2,0$), característico de HRP Composto I, radical oxiferril porfirina π -cátion com acoplamento antiferromagnético entre os elétrons do ferro do grupo heme e o anel porfirínico ($S=1/2$). Como indicado nas Figuras 34, 35 e 36, no decurso da reação, o sinal $g = 6,0$ do ferro hemínico da HRP foi progressivamente recuperado com o concomitante desaparecimento do sinal $g = 2,0$.

A Figura 32 mostra o espectro de EPR da reação HRP no curso da reação com peróxido de hidrogênio, na ausência de imida, sendo 34A, meio heterogêneo (micelas de CTAB em tampão fosfato de sódio) e 34B, meio homogêneo (somente tampão fosfato de sódio). Como indicado na Figura 34A, o CTAB promove o rápido aparecimento do sinal $g = 6,0$ com o simultâneo desaparecimento do sinal $g = 2,0$, o mesmo não ocorre com a reação conduzida em meio homogêneo (Fig. 34B), dessa forma, o CTAB influencia no ciclo catalítico da enzima. Conforme mostrado

anteriormente o CTAB promove alterações na estrutura terciária da enzima que favorece a catálise.

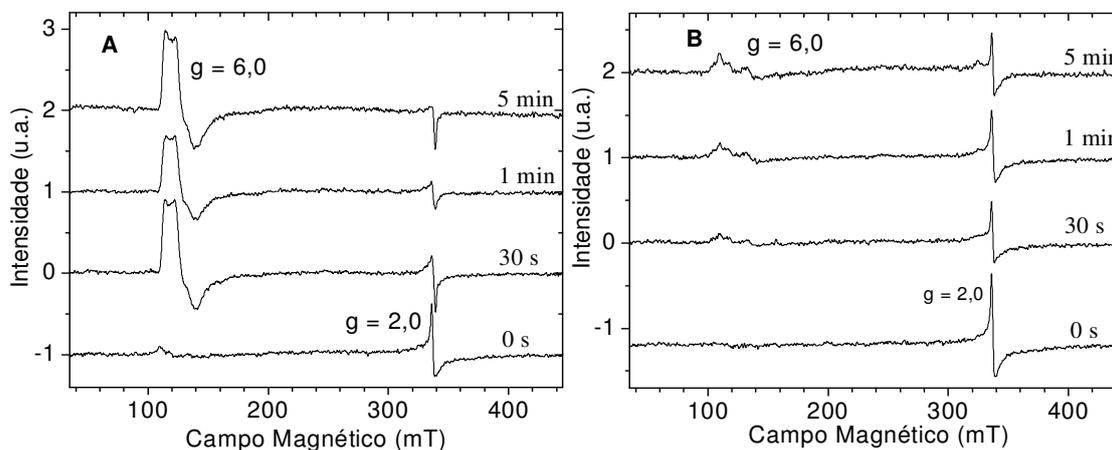


Figura 34. Espectros de EPR na ausência de imida obtidos a 11 K. A - Meio heterogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 em micelas de CTAB 20 mM). B – Meio homogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0). Espectros de 100 μ M de HRP no decorrer da reação com peróxido de hidrogênio 100 μ M. Freqüência de microondas de 9,44079 GHz, *scanning* do campo magnético de 60 G, campo de modulação de 0,1 G e energia de microondas de 5 mW.

Os espectros de EPR no curso da reação de HRP com peróxido de hidrogênio, na presença da imida, DMPN e DPN, fotoativadas são apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente. Sendo A, meio heterogêneo e B meio homogêneo. Analisando as Figuras 35 e 36, notamos que as imidas são capazes de promover mudanças na simetria do ferro hemínico da enzima ($g = 6,0$), quando comparado com a reação conduzida na ausência de imida (Fig. 34). A reação conduzida com a imida DMPN favorece o ciclo catalítico da HRP, pois o tempo total do desaparecimento do sinal $g = 2,0$ com o concomitante aparecimento do sinal $g = 6,0$ foi de 5 minutos, enquanto que a imida DPN com 10 minutos de reação ainda apresentava um pequeno sinal em $g = 2,0$. A recuperação do sinal $g = 6,0$ na imida DPN (Figura 36) mostra que uma das espécies de ferro hemínico é privilegiada ao

longo do tempo. Outro fato relevante na Figura 36 é que o sinal $g = 2,0$ está crescendo até 5 minutos, o que indica que a formação de HRP Composto I está sendo prejudicada nesta condição.

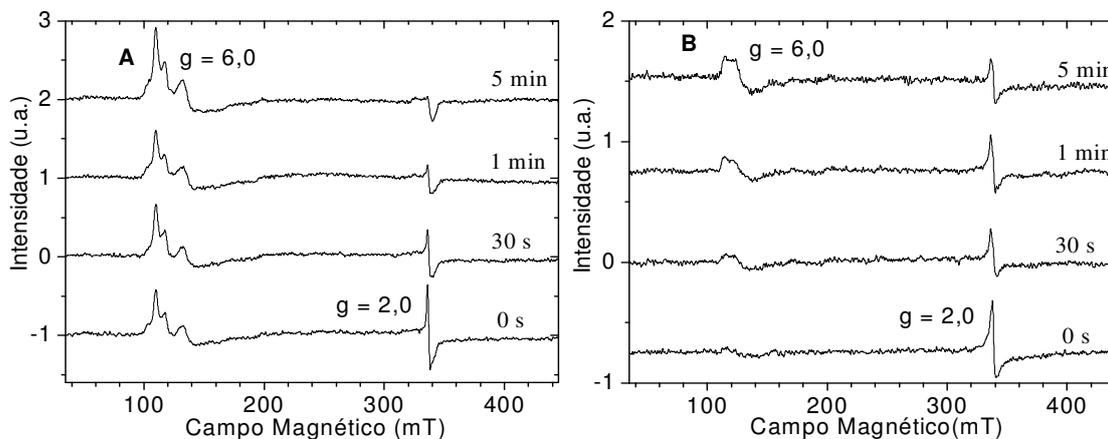


Figura 35. Espectros de EPR na presença da imida DMPN obtidos a 11 K. A - Meio heterogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 em micelas de CTAB 20 mM). B – Meio homogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0). Espectros de 100 μ M de HRP e 24 μ M de DMPN no decorrer da reação com peróxido de hidrogênio 100 μ M. Frequência de microondas de 9,44079 GHz, *scanning* do campo magnético de 60 G, campo de modulação de 0,1 G e energia de microondas de 5 mW.

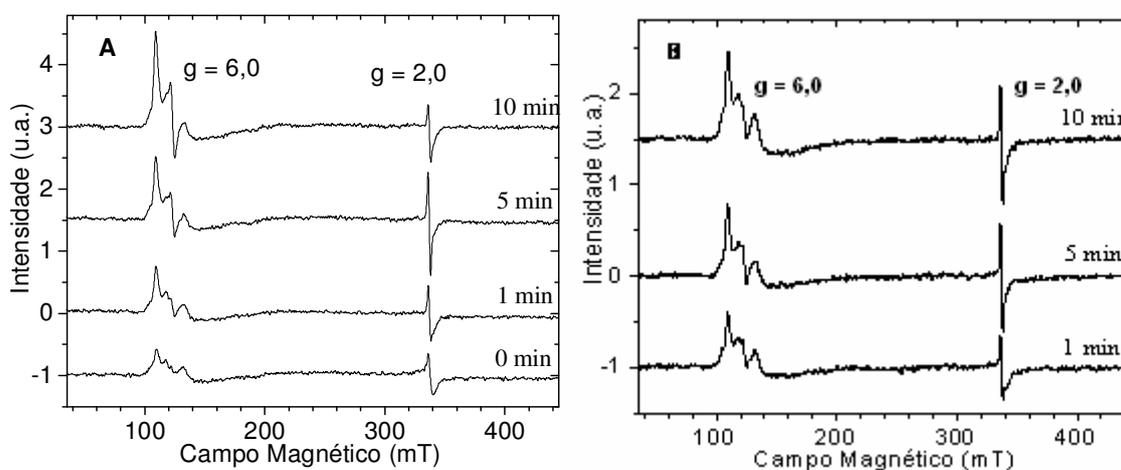


Figura 36. Espectros de EPR na presença da imida DPN obtidos a 11 K. A - Meio heterogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 em micelas de CTAB 20 mM). B – Meio homogêneo (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0). Espectros de 100 μ M de HRP e 24 μ M de DPN no decorrer da reação com peróxido de hidrogênio 100 μ M. Frequência de microondas de 9,44079 GHz, *scanning* do campo magnético de 60 G, campo de modulação de 0,1 G e energia de microondas de 5 mW.

4.3. Parte 3 – Caracterização do Intermediário Formado no Ciclo Catalítico da HRP pela Técnica de EPR Pulsado

A Figura 37 mostra o espectro de RPE de onda contínua (CW) obtido a 11K. A linha vermelha representa o espectro da HRP em seu estado nativo, nota-se na região baixo campo, o sinal do Fe^{+3} ($S = 5/2$). A adição de peróxido de hidrogênio (linha verde) promove o desaparecimento do sinal do ferro, indicando que a HRP foi convertida em intermediários de alta valência da enzima. Ao mesmo tempo, nota-se a formação de um sinal na região de alto campo, característico de HRP Composto I, oxiferril porfirina π cátion com acoplamento antiferromagnético (Fe^{+4} ($S = 1$) + π cátion ($S = 1/2$)). A Figura 38 representa os espectros de RPE obtidos pela técnica pulsada, notamos semelhanças com a Figura 37, em ambas as Figuras, o sinal da HRP nativa (linha vermelha) está entre 1000 e 3500 G e o sinal da HRP Composto I (linha verde) apresenta um máximo de intensidade na região de 3500 G. Como o espectro da Figura 38, representa a intensidade do eco em cada campo, a curva obtida é a integral do sinal, sendo um espectro inteiro, que representa de forma mais clara o sinal obtido. Ao derivar-se o sinal obtido pela técnica pulsada obtêm-se o espectro de onda contínua.

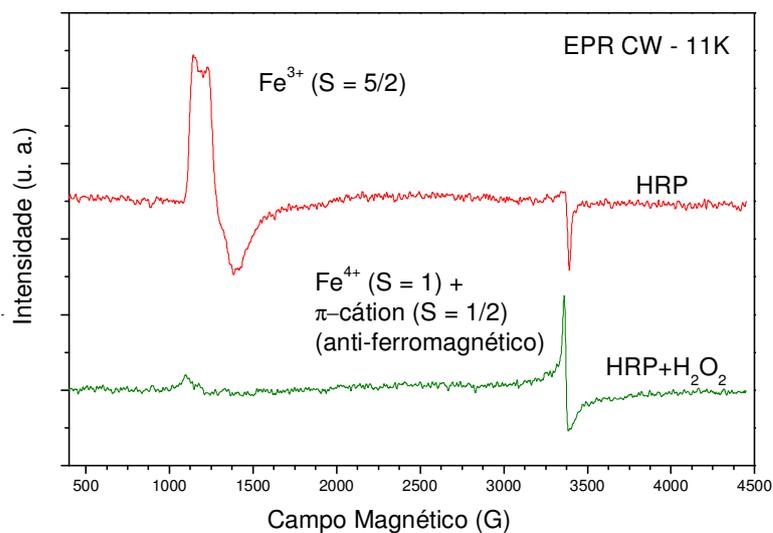


Figura 37. Espectros de EPR CW obtidos a 11 K. As condições experimentais foram 100 μM de HRP e peróxido de hidrogênio 100 μM . A linha vermelha representa a enzima em seu estado nativo e a linha verde representa a reação com peróxido de hidrogênio. Frequência de microondas de 9.44079 GHz, *scanning* do campo magnético de 60 G, campo de modulação de 0.1 G e energia de microondas de 5 mW. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0.

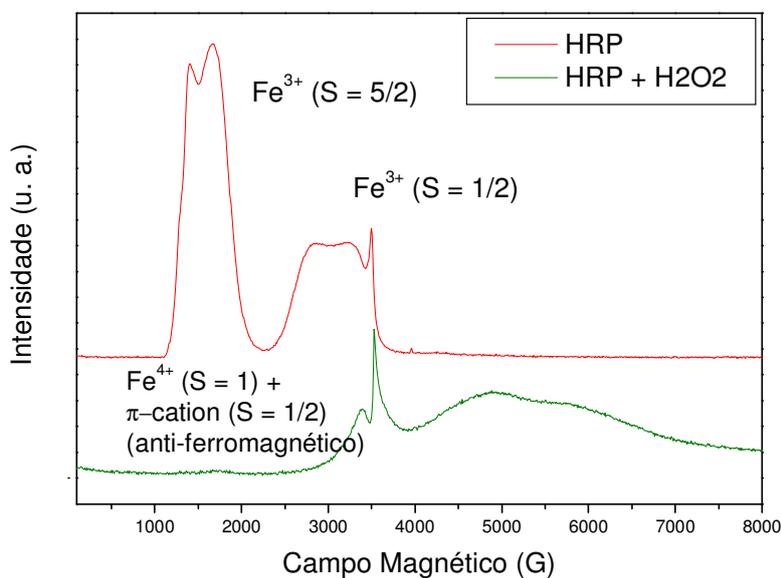


Figura 38. Espectros de EPR pulsado obtidos a 4 K. As condições experimentais foram 100 μM de HRP e peróxido de hidrogênio 100 μM . A linha vermelha representa a enzima em seu estado nativo e a linha verde representa a reação com peróxido de hidrogênio. A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0.

Em enzimas, freqüentemente mais de uma espécie paramagnética está presente, nestes casos, os espectros de RPE CW apresentarão sobreposições e alargamentos adicionais que dificultam a análise qualitativa e quantitativa dos mesmos. Métodos de RPE pulsada ajudam a resolver diferentes contribuições e propriedades destas diferentes espécies paramagnéticas, uma vez que seus tempos de relaxação e momentos magnéticos são diferentes.

Uma vez obtida a Figura 38, foram selecionados alguns valores de campo intenso. Nestes valores o eco gerado em função do pulso foi medido. Esse eco cai exponencialmente, porém devido à vizinhança do centro paramagnético, esta exponencial apresenta oscilações. No caso da HRP, os centros paramagnéticos que influenciam no Fe são o H e o N, essa influência pode ser medida por transformada de Fourier, a partir das oscilações do decaimento exponencial. As Figuras 39 e 40 representam a HRP em seu estado nativo e as Figuras 41 e 42 representam a enzima na presença de peróxido de hidrogênio. As Figuras 39 e 41 mostram na parte superior, a intensidade do sinal obtido em função do campo magnético, a partir de 2 pulsos a 4 K. Na parte inferior, a freqüência dos elementos presentes na vizinhança do ferro. As Figuras 40 e 42 representam a amplitude do sinal em função da freqüência para diferentes valores de campo magnético (ver legenda). A principal diferença entre os experimentos sem peróxido e com peróxido é a presença do H, na vizinhança do ferro, quando a enzima está em seu estado nativo. Na presença de peróxido, somente o nitrogênio apresenta sinal, devido a uma mudança na distribuição eletrônica em volta do ferro, isto é compatível com uma mudança estrutural da enzima.

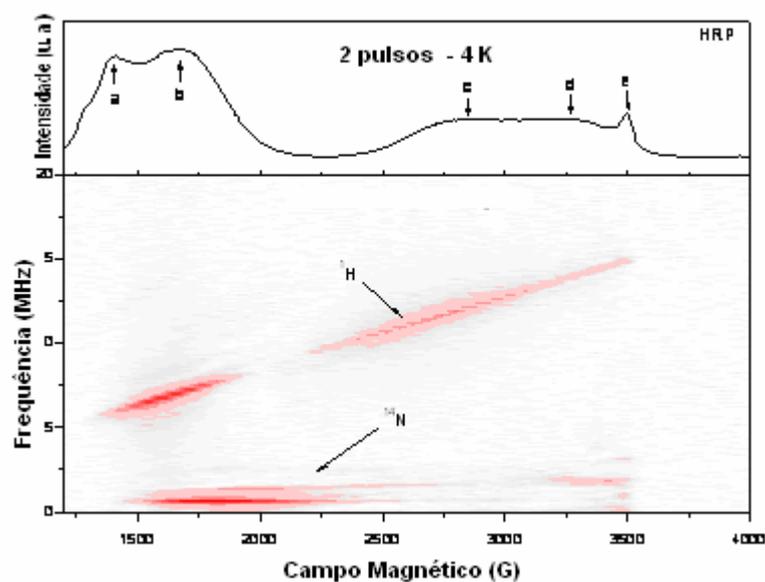


Figura 39. Medidas de HRP nativa, obtidas a 4 K. As condições experimentais foram 100 μ M de HRP em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0. As letras a, b, c, d, e representam os campos magnéticos 1400, 1670, 2850, 3270 e 3493 G, respectivamente.

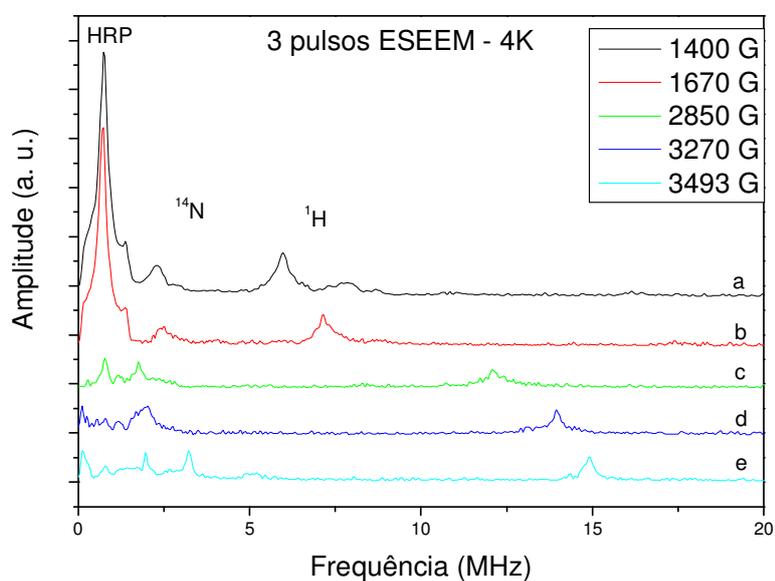


Figura 40. Medidas de amplitude de HRP nativa, obtidas a 4 K. As condições experimentais foram 100 μ M de HRP em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0. As letras a, b, c, d, e representam os campos magnéticos 1400, 1670, 2850, 3270 e 3493 G, respectivamente.

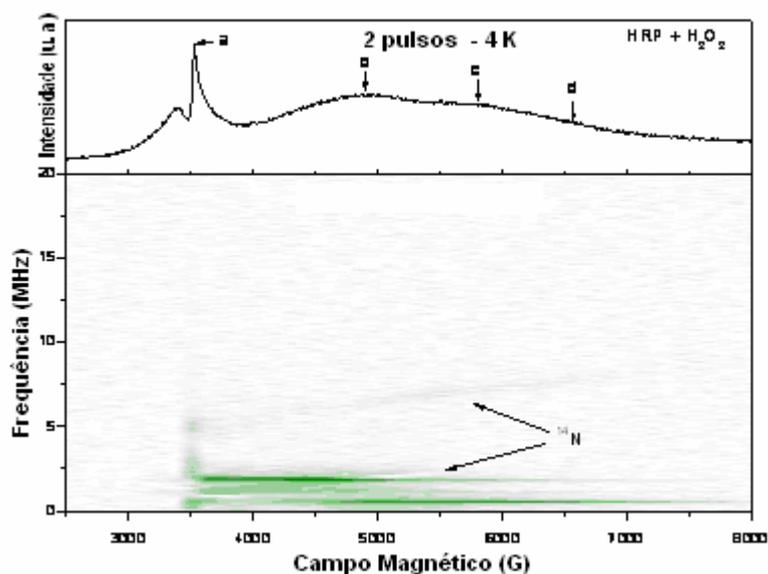


Figura 41. Medidas de HRP com H_2O_2 , obtidas a 4 K. As condições experimentais foram $100 \mu\text{M}$ de HRP, peróxido de hidrogênio $100 \mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0. As letras a, b, c, d, representam os campos magnéticos 3527, 4900, 5800 e 6500 G, respectivamente.

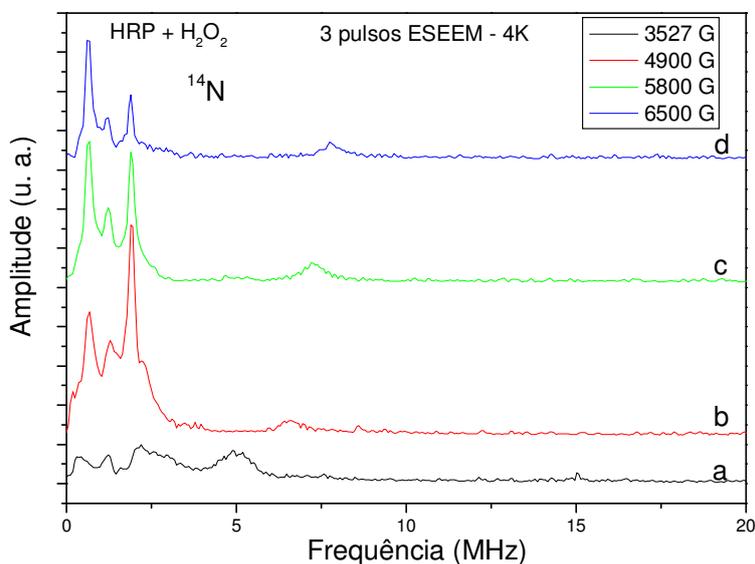


Figura 42. Medidas de amplitude de HRP com H_2O_2 , obtidas a 4 K. As condições experimentais foram $100 \mu\text{M}$ de HRP, peróxido de hidrogênio $100 \mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0. As letras a, b, c, d, representam os campos magnéticos 3527, 4900, 5800 e 6500 G, respectivamente.

Esses resultados apresentados devem ainda ser analisados para se obter os parâmetros hiperfinos, especialmente do nitrogênio por meio de simulações espectrais dos dados de RPE pulsado. Somente após esse estudo poderão ser definidas as características que difere o acoplamento antiferromagnético apresentado pela HRP do acoplamento ferromagnético apresentado por outras hemoproteínas.

5. Conclusões e Sugestões

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o corante azul de metileno e a imida aromática DMPN são capazes de se ligar à estrutura da HRP, e na presença de luz, formar o radical neutro e o ânion radical respectivamente, os quais transferem elétrons às formas de alta valência da enzima. Comparando a imida DMPN fotoativada com o azul de metileno fotoativado notamos que ambos agem como cofatores enzimáticos sendo capazes de acelerar o ciclo catalítico da HRP (depleção de peróxido de hidrogênio). Porém o azul de metileno sofre *bleaching* durante a reação, já a imida DMPN não sofre dano em sua estrutura, sendo significativamente reciclada em sucessivos ciclos redox. Dessa forma, a imida, DMPN se torna a melhor candidata para aplicação em biotecnologia.

Os estudos realizados em meio heterogêneo comprovaram que as micelas de CTAB aumentam a eficiência catalítica da HRP por promover mudanças em sua estrutura terciária.

O estudo realizado com a imida DPN fotoativada mostrou que esta não é eficiente fotorredutora de HRP Composto II, mesmo na presença de micelas de CTAB.

Visando dar continuidade a este trabalho foram estabelecidas como perspectivas futuras:

- Caracterizar o ciclo catalítico da peroxidase de raiz forte (HRP) na presença dos compostos tiazínicos: tioridazina (TR), flufenazina (FP) e trifluoperazina (TFP), similarmente ao apresentado para o azul de metileno e para as imidas aromáticas.

- Obter a forma recombinante da HRP, para em seguida, realizar os experimentos de cristalização da enzima associada ao corante, MB, e determinar a estrutura do complexo por meio de cristalografia de Raio-X.
- Estudar a interação e a capacidade catalítica da HRP em interfaces nanoestruturadas com a imida DMPN para testes como biossensor de peróxido de hidrogênio.
- Elucidar as características que difere o acoplamento antiferromagnético apresentado pela HRP do acoplamento ferromagnético apresentado por outras hemoproteínas por meio da técnica de RPE pulsada.

6. Referências

AGARWALL, L. P. F.; BORISSEVITCH, I. E. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous successive formation of H and J aggregates. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.63, p.227-233, 2006.

ALBERTY, R. A. Alteration of the Kinetic Properties of an Enzyme By the Binding of Buffer, inhibitor, or Substrate. **J. Am. Chem. Soc.**, n.75, p. 1928-1932, 1953.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactant Systems: their chemistry pharmacy and biology**, 1^o ed, Chapman & Hall, London, 1983.

AVELINE, B.M.; MATSUGO, S.; REDMOND, R.W. Photochemical Mechanisms Responsible for the Versatile Application of Naphthalimides and Naphthaldimides in Biological Systems **J. Am. Chem. Soc.**, n. 119, p. 11785, 1997.

BAEK, H. K.; KÖSTER, J.; VAN WART, H. E. Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound O, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. **Biochemistry**, v. 28, p. 5714-5719, 1989.

BAPTISTA, M.S.; INDIG, G.L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. **The Journal of Physical Chemistry B.**, v. 102, p. 4678-4688, 1998.

BARZ, W.; KÖSTER, J.; VAN WART, H. E. Turn over and degradation of secondary (natural) products. In: CON, E. E.; STUMPF, P. K. (Ed.) **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, vol.7, cap.15, p. 457-479, 1981.

BERGLUND, G. L.; CARISSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZOKE, H.; HERIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish Peroxidase at high resolution. **Nature**, n. 417, p. 463-468, 2002.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. Kinetics of Enzyme Action. **Biochem. J.** n. 19, p. 338-339, 1925.

BROCHSZTAIN, S.; POLITI, M.J., Novel self-assembled films of zirconium phosphonate/1,4,5,8-naphthalenediimides **Langmuir**, n. 7, p. 1419, 1999.

CAMPOS, I. B.; NANTES, I. L.; POLITI, M. J.; BROCHSZTAIN, S., Photochemical Reduction of Cytochrome *c* by a 1,4,5,8-Naphthalenediimide Radical Anion **Photochem. Photobiol.**, n. 80, p. 518-524, 2004.

CASTILHO, F.J., GREPPIN, H., Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *sedum album* leaves after ozone exposure. **Physiol. Plant.**, v. 68, n. 201, 1986.

CASTILHO, F.J., GREPPIN, H., Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. **Experientia**, v. 43, n. 111, 1987.

CHANG, H., SIEGEL, B.Z., SIEGEL, S.M. Salinity induced changes in isoperoxidase in taro, *Colocasia esculenta*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 233, 1981.

CHAN, M. S.; J. R. BOLTON. Structures, reduction potentials and absorption maxima of synthetic dyes of interest in photochemical solar-energy storage studies. **Solar Energy**, v. 24, n. 6, p. 561–574, 1980.

CLELAND, W. W. **The Enzymes**, Ed. Academic, New York, VOL. XIX, p. 99-158, 1990.

DAVIES, T. S.; KETNER, A. M.; RAGHAVAN, S. R. A Simple Class of Photorheological Fluids: Surfactant Solutions with Viscosity Tunable by Light. **J.AM. CHEM. SOC.**, v. 128, p. 6669-6675, 2006.

DEARDEN, L.V.; WOOLLEY, E.M. Osmotic coefficient of CTAB in water and in aqueous sodium bromide solutions at 55°C. **J. Phys. Chem.**, v. 91, n. 9, p. 2404-2408, 1987.

DEGIORGIO, V.; CORTI, M. **Physics of Amphiphiles, Micelles, Vesicles and Microemulsions**, Amsterdam: Research, 1985.

DESHPANDE, S. S. **Enzyme Immunoassays**, From Concept to Product Development, Chapman and Hall, p. 169-171, 1996.

DUNFORD, H. B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1992.

DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

DUNFORD, H. BRIAN. Kinetic and Mechanism of Mammalian Heme Peroxidase Reactions. **Progress in Reaction in Kinetic and Mechanism**. Vol. 30, p. 245-265, 2005.

ELWORTHY, P. H.; FLORENCE, A. T.; MACFARLANE, C. B. **Solubilization by surface active agents**. Chapman & Hall, London, 1968.

ESPELIE, K.E., FRANCESCHI, V.R., KOLATTUKUDY, P.E. Immunocytochemical Localization and Time Course of Appearance of an Anionic Peroxidase Associated with Suberization in Wound-Healing Potato Tuber Tissue. **Plant Physiol.**, v. 81, n. 2, p. 487-492, 1988.

ESTEVAM, M. L.; NASCIMENTO, O. R., BAPTISTA, M. S.; MASCIU, P. D.; PRADO, F. M.; ALARIO, A. F.; ZUCCHI, M. R.; NANTES, I. L. Changes in the spin state and reactivity of cytochrome C induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals. **J. B. Biol. Chem.**, n. 279, p. 39214-39222, 2004.

EVERSE, J., GRISHAM, M.B., **Peroxidases in chemistry and biology**, cap. 3, p. 28, 2000.

FENDLER, J. H.; FENDLER, E. J. **Catalysis in micellar and macromolecular systems**. Academic Press, NY, 1975.

FENDLER, J. H. **Membrane mimetic chemistry**. New York: John & Sons, 1982.

FIGUEIREDO, K. M.; MARCON, R. O.; CAMPOS, I. B.; NANTES, I. L.; BROCHSZTAIN, S. Photoinduced electron transfer between cytochrome *c* and a novel 1, 4, 5, 8-naphthalenetetracarboxylic diimide with amphiphilic character. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. n. 79, p. 1-9, 2005.

FOLKS, L. K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of 3 indole-3-acetic acid to cytotoxic species- a potential new role for plant auxins in for use in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.** n. 61, p. 129-136, 2004.

FOLKS, L. K.; GRECO, O.; DACHS, G. U.; STRAFORD, M. R. L. WARDMAN, P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.** n. 64, p. 265-272, 2006.

FRYLINCK, L., DURBERY, I.A., SCHARBORT, J.C., Biochemical changes involved in stress response and ripening behaviours of Y-irradiated mango fruit. **Phytochemistry**, v. 26, n. 681, 1987.

FURTADO, K. DE M. F. Caracterização de Novas Imidas Aromáticas Com Aplicações Biotecnológicas. Mogi das Cruzes, 2005. p. 85. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**, Universidade de Mogi das Cruzes.

GAINES, G. L. **Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces**. Interscience, New York, 1966.

GANDINI, S.C.M.; YUSHMANOV, V.E.; BORISSEVITCH, I.E.; TABAK, M. Interaction of the tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin with ionic surfactants : aggregation and location in micelles **Langmuir**, n.15, p. 6233, 1999.

GASPAR, T. H.; PENEL, C. L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**, Genève , p.313, 1982.

GEBICKA, L.; GEBICKA, J. L. Kinetic studies on the interaction of ferricytochrome c with anionic surfactants. **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, n.2, p. 165-172, 1999.

GREENFIELD, S.R.; SVEC, W.A.; GOSZTOLA, D. AND WASIELEWSKI, M.R. J. Multistep Photochemical Charge Separation in Rod-like Molecules Based on Aromatic Imides and Diimides **Am. Chem. Soc.**, n. 118, p. 6767, 1996.

GRISEBACH, H. **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York, v. 7, p. 457-479, 1981.

GRUEN, D. W. R. The standard picture of ionic Micelle. **Progr. Colloid Polym. Sci.**, v.70, p. 6, 1985.

HALLDORSON, V. S. N., DURAN, N. L., Bioluminescent Bacteria: Lux Genes as Environmental Biosensors, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 91-96, 2003.

HAZELL, P., MURRAY, D.R. Peroxidases isoenzymes and leaf senescence in sunflower *Helianthus annuus* L. **Pflanzenphysiol.**, n. 108, v. 87, 1982.

HENRIKSEN, A.; GAJHEDE, M. Crystal structure of horseradish Peroxidase C at 2.15 Å resolution. **Acta Cryst.**, n.51, p. 121-123, 1995.

HEATH, R.L., Initial events in injury to plants by air pollutants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 31, n. 395, 1980.

HINER, N. P. A.; RUIZ, J. H.; LÓPEZ, J. N. R.; CÁNOVAS, F. G.; BRISSET, N. C.; SMITH, A. T.; ARNAO, M. B.; ACOSTA, M. Reactions of the Class II Peroxidases, Lignin Peroxidase and *Arthromyces ramosus* Peroxidase, with Hydrogen Peroxide. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 30, p. 26879-26885, 2002.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelles interfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, n. 4, p. 2320–2328, 2002.

KASAI, S.; VAN HUUSTEE, R. B.; BUDDE, C. L. Simultaneous detection of uric acid and glucose on a dual-enzyme chip using scanning electrochemical microscopy/scanning chemiluminescence microscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 2, p. 263-270, 2002.

KRIEG, R.; HALBHUBER, K. J. Recent advances in catalytic peroxidases histochemistry. **Cellular Mol. Biol.** n. 49, p. 547-563, 2003.

LAGRIMINI, L.M., ROTHSTEIN, S. Tissue Specificity of Tobacco Peroxidase Isozymes and Their Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. **Plant Physiol.**, n.84 p. 438-442, 1987.

LI, G.; LIU, X; DU, L.; WANG, E. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized in Calcium Carbonate Microsphere Doped with Phospholipids. **Electroanalysis**, n. 20, p. 1421-1426, 2008.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**. California, 1994.

LEIDI, E.O., GOMEZ, M., De La GUARDIAN, M.D., Evaluation of catalase and peroxidase as indicators of Fe and Mn: activity of metalloenzymes. **Plant Soil**, v. 99, n. 139, 1987.

LEITE, O. D., FATIBELLO, O. F., BARBOSA, A.M. Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Modified with a Crude Extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostreatus*), **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 297-303, 2003.

MAEDA, Y.; FUJIHARA, M.; IKEDA, I. Spectroscopy study on structure of horseradish peroxidase in water and dimethyl sulfoxide mixture. **Biopolymers**, v.67, n. 2, p. 107-112, 2002.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCON, R. O. Caracterização de filmes automontados de fosfonato de zircônio contendo imidas aromáticas. Mogi das Cruzes, 2008. p. 163. **Tese de Doutorado em Biotecnologia**, Universidade de Mogi das Cruzes.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochem. Z.** n. 49, p. 333-369, 1913.

MIELLISH, K. J., R. D. COX, D. I. VERMON, J. GRIFFITHS AND S. B. BROWN. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochem. Photobiol.**, v. 75 n. 4, p. 392–397, 2002.

MILLER, L.L.; ZHONG, C.J.; KASAI, P. Production of a Polymer with Highly Anisotropic Conductivity and Structure by Co-Electrodeposition of an Imide Anion Radical and Polycation **J. Am. Chem. Soc.**, n. 115, p. 5982, 1993.

MISRAN, M., D. MATHEUS, P. VALENTE AND A. HOPE. Photochemical electron transfer between methylene blue and quinones. **Aust. J. Chem.**, n. 47, p. 209–216, 1994.

MOGHARRAB, N.; GHOURECHIAN, H.; AMININASAB, M. Structural stabilization and functional improvement of horseradish peroxidase upon modification of accessible lysines. **Biophys. J.**, n. 92, p.1192-1203, 2007.

MOROI, Y. **Micelles: Theoretical and applied aspects**. 1^{ed}, Plenum Press, NY, 1992.

MUROV, S. L., I. CARMICHAEL AND G. L. HUG. **Handbook of Photochemistry**, 2 ed. New York: Marcel Dekker Incorporation, 1993.

NAKAGIMA, R.; YAMAZAKI, I. The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, n. 262, p. 2576-2581, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, Sarvier, 2000.

OHLIN, S. M., S. LEE, S. WILLIAMS AND C. CHANG. Quantification of methylene blue aggregation on a fused silica surface and resolution of individual absorbance spectra. **Chem. Phys. Lett.**, n. 346, p. 9–15, 2001.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Catalytic sites of hemoprotein peroxidases (review) **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, n. 32, p. 89-107, 1992.

PARKASH, J.; ROBBLEE, J. H.; AGNEW, J.; GIBB, E.; COLLINGS, P.; PASTERNAK, R. F.; DE PAULA, J. C. Depolarized resonance light scattering by porphyrin and chlorophyll a aggregates. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 2089-2099, 2008.

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E.; Solubilization in micellar systems. Analytical and environmental applications. **Anal. Chim. Acta**, v. 169, p. 1, 1985.

PENNEAU, J.F.; STALLMAN, B.J.; KASAI, P.H.; MILLER, L.L. An imide anion radical that dimerizes and assembles into π -stacks in solution. **Chem. Mater.**, n. 3, p. 791, 1991.

PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R.; TERSARIOL, I. L. S.; ALARIO, A. F.; NANTES, I. L. Microperoxidase-8 Associated to CTAB Micelles: A New Catalyst with Peroxidase Activity. **J. of Phys. Chem.**, n. 108, p. 11124 – 11132, 2004a.

PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L. Microperoxidase-9 cycle in the presence of cetyltrimethylammonium bromide micelles: tert-butyl hydroperoxide as both an oxidizing and a reducing agent. **Progr. Colloid Polym. Sci.**, n. 128, p. 193-198, 2004b.

PRIETO, T.; MUGNOL, K. C.U.; ARAUJO, J. C.; SOUZA, F. L.; SOARES, V. A.; CILENTO, G.; NANTES, I. L. **Peroxidase model systems in heterogeneous media**. In: Iseli L. Nantes; Sergio Brochsztain. (Org.). *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala, India: Research Signpost, p. 1-29, 2007.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases **Euro Journal Pharmacol.**, v. 533, p.222-239, 2006.

RAKHIT, G.; SPIRO, T. G.; UYEDA, M. Symmetry states of metalloporphyrin π -cation radicals, models for peroxidase compound I. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n.71, p. 803-808, 1976.

RODRIGUES, M.A.; BROCHSZTAIN, S.; BARROS, T.C.; BAPTISTA, M.S. AND POLITI, M.J. pH-Dependent Excited-State Properties of N,N'-di(2-phosphonoethyl)-1,4,5,8-naphthalenediimide. **Photochem. Photobiol.**, v. 70, n. 35, 1999.

SAVENKOVA, M.I.; KUO, J.M.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Improvement of peroxygenase activity by relocation of a catalytic histidine within the active site of horseradish peroxidase. **Biochemistry**, n. 37, p. 10828-10836, 1998.

SCHIMIT, T. F.; CASELI, L.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JR, O. N. Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids. **Colloids and Surface A: Physicochemical and engineering aspects**, n. 321, p. 206-210, 2008.

SCHULZ, C. E., RUTTER, R.; SAGE, J. T.; DEBRUNNER, P. G. and HAGER, L. P. Mossbauer and Electron Paramagnetic Resonance Studies of Horseradish Peroxidase and Its Catalytic Intermediates. **Biochemistry**, 23, 4743-4754, 1984.

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.; GABRIELE, D.; GUGLIOTTI, M. AND BAPTISTA, M. S. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. **Photochem. Photobiol.**, n. 77, v. 5, p. 459-468, 2003.

SMITH, A. T.; VEITCH, N. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, n. 2, p. 269-278, 1998.

STRACK, D. **Phenolic metabolism** In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant biochemistry**. London: Academic Press, p. 387-416, 1997.

SOARES, V. A.; SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H. C.; TERSARIOL, I. L. S.; SHIDA, C. S.; BAPTISTA, M. S.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L. Light-Driven Horseradish Peroxidase Cycle by Using Photo-activated Methylene Blue as Reducing Agent. **Photochemistry and Photobiology**, 2007, 83, 1254-1262.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. 2° ed, Florida: Krieger, 1991.

TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L. F.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.4158-63, 1995.

TIEN, H. T. *Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice*, Marcel Dekker, New York, 1974.

THOMPSON, M. A. ArgusLab 4.0.1; **Planaria Software LLC**, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>. Acesso em: 02 de agosto de 2006, 14:30.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, n. 65, p. 249-259, 2004.

VELDE, DE V. F.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of Peroxidases in organic synthesis. **Trends Biotechnol.** n. 19, p. 73-80, 2001.

VIEHBECK, A.GOLDBERG, M.J. AND KOVAC, C.A . Multistep Photochemical Charge Separation in Rod-like Molecules Based on Aromatic Imides and Diimides **J. Electrochem. Soc.**, n. 137, p. 1460, 1990.

WAINWRIGHT, M., D. A. PHOENIX, L. RICE, S. M. BURROW AND J. WARING. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v. 40 n. 3, p. 233-239, 1997.

WELINDER, K. G. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 6, p. 483-502, 1979.

ZAMARAEV, K. I. **Catalysis Today**, New York, v. 35, n. 3, 1997.

APÊNDICE - *Flash*-fotólise e Espectroscopia de Ressonância

Paramagnética Eletrônica (RPE)

I. *Flash*-fotólise

A técnica de *flash*-fotólise foi introduzida em 1949 pelos ingleses George Porter e Ronald G.W. Norrish, ao estudarem reações rápidas, é um método útil para estudo dos espectros de absorção de espécies transientes, de estados excitados e a dinâmica da sua transformação. Esta técnica utiliza um pulso intenso e curto de radiação óptica, com frequência na qual a amostra absorva, dessa maneira, o sistema é perturbado o que promove um grande número de moléculas para o estado excitado, que pode emitir fluorescência, reagir ou dissipar a energia na forma de calor. Uma luz contínua de análise incidindo sobre a amostra, irá monitorar as mudanças na absorção enquanto as moléculas ainda se encontram no estado transiente. Desta forma, o princípio básico desta técnica consiste em monitorar a dependência temporal da absorção óptica do sistema. A técnica permite determinar espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com curtos tempos de vida induzidos pela luz.

I. 1. Estados Excitados Singletes e Tripletes

Quando ocorre uma transição eletrônica, o elétron pode conservar ou inverter seu spin, que é o campo magnético gerado pelo movimento do elétron em torno de si mesmo. Isto dará origem aos chamados estados excitados singletes, se houver conservação de spin, e tripletes, se houver inversão. Há dois aspectos importantes neste ponto:

- estados excitados tripletes possuem menor energia que singletes. A explicação desse fato baseia-se na regra de Hund, que estabelece que quando os elétrons têm o mesmo spin, eles devem evitar-se, portanto, haverá menor repulsão eletrostática entre os mesmos;

- as transições onde ocorre mudança de spin são proibidas, ou seja, são pouco prováveis. Isto ocorre porque em uma transição deve haver conservação do momento magnético produzido pelo elétron (spin). Experimentalmente, esta é uma propriedade muito interessante, pois reflete diretamente no tempo de vida das espécies em estado excitado. Para tripletes, o tempo de vida é da ordem de 10^{-3} a 10^0 s, portanto, muito superior ao tempo de vida de uma espécie singlete 10^{-9} a 10^{-6} (TURRO, 1991).

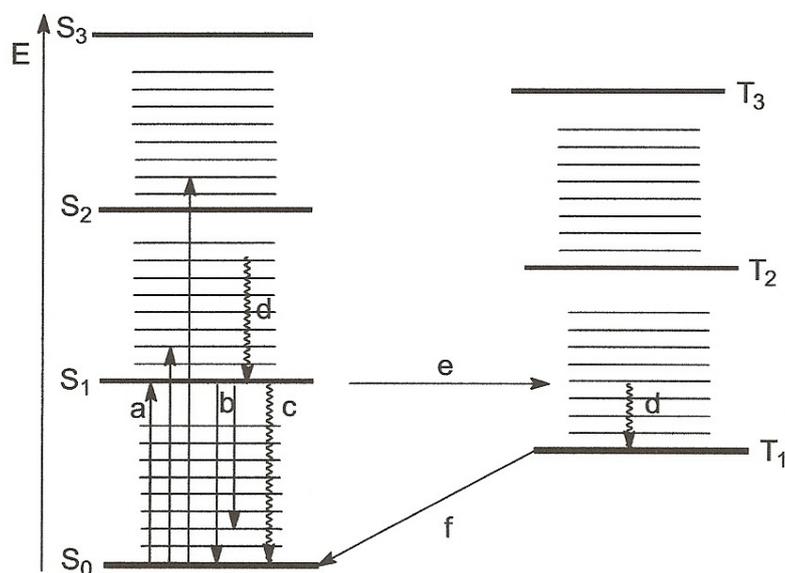
I. 2. Processos de Desativação de um Estado Eletronicamente Excitado

Obviamente, uma molécula em estado excitado é termodinamicamente instável e deve desativar-se voltando ao estado fundamental. Abaixo são descritos os vários processos que podem acontecer após a excitação eletrônica:

- **fluorescência:** uma molécula em seu estado excitado singlete pode reemitir a energia absorvida na forma de fóton, usualmente de menor energia (maior comprimento de onda), pois ocorre relaxação vibracional do estado excitado.
- **cruzamento inter-sistema:** uma molécula em estado excitado singlete pode ser convertida em triplete. Embora este processo seja termodinamicamente favorável, pois a energia singlete é sempre maior que a energia triplete, ele é proibido pela regra de conservação de spin. Por outro lado, esta regra pode ser parcialmente quebrada quando ocorrer o chamado acoplamento spin-orbital. Neste caso, uma interação entre os campos magnéticos gerados pelos movimentos do elétron em torno de si mesmo (spin) e pelo movimento no próprio orbital criam uma força capaz de inverter o spin do elétron. Este efeito é evidenciado quando há átomos de elevada massa molecular.

- **fosforescência:** é a desativação radiativa de um estado triplete para o estado fundamental singlete. Uma comparação entre fosforescência e fluorescência revela duas características principais que distinguem entre estado excitado tripletes e singletes. Uma delas é o tempo de vida do estado excitado, sendo para o singlete da ordem de nanosegundos e, para o triplete, de milissegundos a segundos. A outra é obviamente a mais energia dos estados tripletes e, portanto, emissão de luz em comprimento de onda maior;
- **desativação térmica:** uma molécula em estado excitado pode perder energia por relaxação vibracional, ou seja, convertendo a energia de excitação eletrônica em calor (relaxação vibracional ou conversão interna);
- **transferência de energia:** uma molécula pode desativar-se transferindo a sua energia para outra molécula promovendo a sua excitação;
- **foto-reação:** uma vez em estado excitado, uma molécula pode sofrer uma profunda mudança em suas propriedades químicas, assim, reações que não seriam possíveis com os reagentes no estado fundamental tornam-se factíveis. Um bom exemplo são as reações com oxigênio excitado singlete, que perde a sua característica de um birradical e comporta como uma olefina (dupla ligação). Outro exemplo importantíssimo é a fotossíntese, neste caso, a excitação da molécula de clorofila promove um decréscimo no seu potencial de redução, aumentando a sua tendência em doar elétrons, tornando-a, dessa forma, capaz de reduzir o NADP^+ à NADPH , que após uma seqüência de reações e juntamente com ATP irá converter o CO_2 em glicose.

O diagrama da figura A1 esquematiza os processos citados anteriormente (diagrama de Jablonski) (LOWRY, T. e RICHARDSON, 1987).



S₀ : estado fundamental

S₁, S₂, S₃: estados excitados singletes

T₁, T₂, T₃: estados excitados tripletes

(a) : absorção

(b) : fluorescência

(c) : conversão interna

(d) : relaxação vibracional

(e) : cruzamento inter-sistema

(f) : fosforescência

—————> transições radiativas

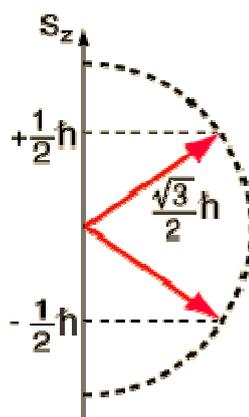
~~~~~> transições não radiativas

**Figura A1.** Diagrama de Jablonski.

## II - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), EPR em inglês, também conhecida como ressonância do spin eletrônico (ESR) tem sido utilizada para mapear a distribuição de um elétron desemparelhado em uma molécula, fornecendo informações nos seguintes processos: reações de transferência de elétrons, determinação da simetria na qual o sítio paramagnético está envolvido, na indicação de radicais produzidos durante reações de oxi-redução e em mecanismo de atividades enzimáticas, entre outras (FEHER, 1969).

O spin de um elétron é uma grandeza dada pela orientação de seu giro sobre si mesmo, dando ao elétron uma quantidade intrínseca de movimento angular, caracterizado pelo número quântico magnético ( $m_s$ ). Assim, o elétron que gira em sentido horário (representado pelo vetor voltado para baixo -  $\downarrow$ ) tem o valor de  $m_s$  igual a  $-1/2$ , já o elétron que gira em sentido anti-horário (vetor voltado para cima -  $\uparrow$ ) tem o valor de  $m_s$  igual a  $+1/2$ .



**Figura A2** – Representação dos valores de spin do elétron.

Os elétrons, pelo princípio de exclusão de Pauli, ocupam cada orbital do átomo com máximo 2 elétrons, emparelhados, ou seja, com spins de sinais

diferentes. Naturalmente os elétrons ocupam os orbitais com nível de energia mais baixo, passando para os de maior energia, quando os primeiros já estão ocupados ou quando ocorre um estímulo que os lancem para níveis mais energéticos.

De maneira geral, a identificação das espécies paramagnéticas é fornecida por um parâmetro denominado fator g efetivo, definido como “tensor giromagnético”. O valor de g pode ser calculado a partir da posição da linha de ressonância no espectro. Na equação abaixo, g é o fator adimensional que caracteriza a relação das grandezas energéticas,  $h \cdot \nu / \beta_e H$ , h é a constante de Planck em Js,  $\nu$  é a frequência de operação do equipamento em  $s^{-1}$ ,  $\beta_e$  é o magneton de Bohr em  $J \text{ Gauss}^{-1}$  e H é o campo magnético em Gauss.

$$g = h \cdot \nu / \beta_e H$$

Em compostos contendo átomos leves, como os de radicais livres, o valor do fator g é próximo ao valor de fator  $g_e$  do elétron livre ( $g_e = 2,0023$ ), na faixa de 2,0020 a 2,0060. Em espécies químicas constituídas por átomos paramagnéticos mais pesados, como os dos íons dos metais de transição, os acoplamentos spin – órbita são maiores e os valores de g sofrem maior variação (FEHER, 1969).

Nas hemoproteínas o espectro típico do íon  $Fe^{3+}$  quando examinada em baixa temperatura exibe duas linhas, uma muito intensa em campo baixo ( $g_{\perp} = 6$ ) e outra de pequena intensidade em campo alto ( $g_{\parallel} = 2$ ), característico de uma simetria axial e de campo cristalino fraco. Mudanças nesse espectro podem ser utilizadas para descrever variações de simetria e de intensidade de campo cristalino na região onde o íon ferro está inserido na proteína.

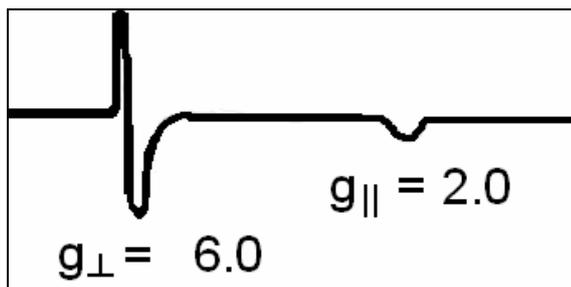


Figura A3: **Espectro de RPE do íon  $\text{Fe}^{3+}$  em campo cristalino axial fraco (DRAGO, 1992).**

A equação acima se refere a uma descrição muito simples do sistema. Na realidade, a expressão das energias é mais complexa devido aos acoplamentos do dipolo magnético do elétron desemparelhado com o dipolo magnético do núcleo do átomo, e fatores anisotrópicos que resultam nas chamadas interações hiperfinas. O número de linhas da interação hiperfina é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear,  $2I+1$ , onde  $I$  é o número quântico de spin nuclear. No caso, por exemplo, de  $I = 1/2$ , (átomo de H), a linha de EPR será dividida em duas linhas, e a separação dessas duas novas linhas corresponde ao valor da interação dos dipolos magnéticos, elétron – núcleo, que, em Gauss, ou outra unidade correspondente, é o valor da constante de interação hiperfina ( $A$ ).

Nos casos nos quais somente um centro paramagnético é presente na proteína, um simples experimento unidimensional (1D) de RPE de onda contínua (CW) pode fornecer informações detalhadas a respeito das propriedades das espécies paramagnéticas, tais como seu estado de oxidação, simetria, ligante e concentração. Em casos mais realistas, como em enzimas, a situação é bem mais complexa, pois freqüentemente mais de uma espécie paramagnética está presente (algumas delas podem ser formadas transientemente dentro de um ciclo catalítico da enzima), as quais estão também sujeitas a dinâmica interna. Nestes casos, os

espectros de RPE CW apresentarão sobreposições e alargamentos adicionais que dificultam a análise qualitativa e quantitativa dos mesmos. Métodos de RPE pulsada ajudam a resolver diferentes contribuições e propriedades destas diferentes espécies paramagnéticas, uma vez que seus tempos de relaxação e momentos magnéticos são diferentes.

## **II. 1. Técnicas de RPE pulsada: Espectroscopia de Modulação do Envelope do Eco do Spin (ESEEM) como Ferramenta para o Estudo de Centros Metálicos**

Por mais de 30 anos, técnicas de Ressonância Paramagnética Eletrônica têm sido ferramentas importantes para a caracterização de centros metálicos em sistemas modelos e/ou sítios ativos de metaloproteínas. Grande parte da informação obtida por RPE sobre a composição, estrutura e características das ligações de tais centros vem da análise dos acoplamentos hiperfinos e, ocasionalmente, quadrupolares entre o spin eletrônico e o spin nuclear associado com ligantes ou núcleos localizados nas imediações do centro paramagnético (por exemplo,  $^1\text{H}(I=1/2)$ ,  $^{14}\text{N}(I=1)$ ,  $^{31}\text{P}(I=1/2)$ ,  $^{19}\text{F}(I=1/2)$ ,  $^{23}\text{Na}(I=3/2)$ ).

Um objetivo na aplicação de RPE para o estudo de centros paramagnéticos é a determinação mais completa possível dos valores dos diversos acoplamentos presentes no sistema. Estes, quando devidamente interpretados, fornecem uma gama de informações a respeito da estrutura química, eletrônica e molecular do sistema em estudo. Para amostras policristalinas ou congeladas, o espectro de RPE é formado pelo envelope de ressonâncias estreitas correspondentes às diversas orientações do centro paramagnético em relação ao campo magnético externo. As características de um espectro de RPE desse tipo são determinadas por vários

parâmetros, sendo a simetria e os valores das componentes dos tensores  $g$  e  $A$ , e as larguras de linhas aqueles mais importantes. Interações quadrupolares, que estão presentes no caso de sistemas contendo núcleos com  $I > 1/2$ . A princípio, os acoplamentos hiperfinos e quadrupolares se manifestam na forma de desdobramentos das linhas do espectro de RPE.

Entretanto, os espectros de compostos metálicos e metaloproteínas são usualmente compostos por linhas alargadas não homoganeamente (MIMS e GESHWIND, 1972a), o que faz com que os acoplamentos hiperfinos e quadrupolares não sejam muitas vezes resolvidos em tais espectros e, por conseguinte, a informação daí proveniente fique perdida.

Para recuperar essa informação, existem basicamente duas técnicas de RPE: (1) “electron nuclear double resonance” (ENDOR) (FEHER, 1956; KEVAN e KISPERT, 1976) e (2) “electron spin echo envelope modulation” (ESEEM) (ROWAN, 1965; DIKANOV e TSVETKOV, 1992). Em ambas, as transições nucleares são monitoradas indiretamente através das transições eletrônicas. No experimento de ESEEM, as transições nucleares são observadas devido à mistura das frequências das transições permitidas e “semi-proibidas” de RPE (MIMS, 1972b; DIKANOV e TSVETKOV, 1992), que foram coerentemente excitadas por pulsos curtos e intensos de microondas. Em contraste, no experimento de ENDOR o sinal é obtido através da irradiação combinada por microondas e radiofrequência, que excitam diretamente tanto as transições de RPE quanto as de RMN.

Embora os espectros obtidos via ESEEM e ENDOR sejam geralmente diferentes, essas técnicas contribuem com informações complementares: ESEEM é a técnica mais apropriada para a medida de acoplamentos hiperfinos fracos, enquanto CW-ENDOR funciona melhor para acoplamentos fortes.

## II. 2. Aspectos Básicos da Espectroscopia de ESEEM

O efeito de modulação do envelope do eco (sinal) de spin foi introduzido por MIMS, 1972b, sendo um método bastante adequado para a medida de acoplamentos hiperfinos e quadrupolares fracos. Os princípios do método são discutidos em detalhes por MIMS e PEISACH, 1981 e DIKANOV e TSVETKOV, 1992. A metodologia envolvida com a técnica de ESEEM baseia-se na utilização do fenômeno de “electron spin echo” (ESE) para a medida de transições de núcleos magneticamente acoplados ao elétron desemparelhado. Para tanto, ecos de spins são formados pela aplicação de dois ou mais pulsos ressonantes de microondas. Além de induzir transições eletrônicas, os pulsos de microondas também induzem as chamadas transições “semi-proibidas” de spins nucleares magneticamente acoplados ao spin eletrônico (MIMS e PEISACH, 1981; DIKANOV e TSVETKOV, 1992), dando origem às frequências de modulação da amplitude do eco correspondentes ao espectro de ENDOR. Para tanto, os pulsos de microondas devem ser suficientemente curtos para excitar todo o intervalo de frequências nucleares.

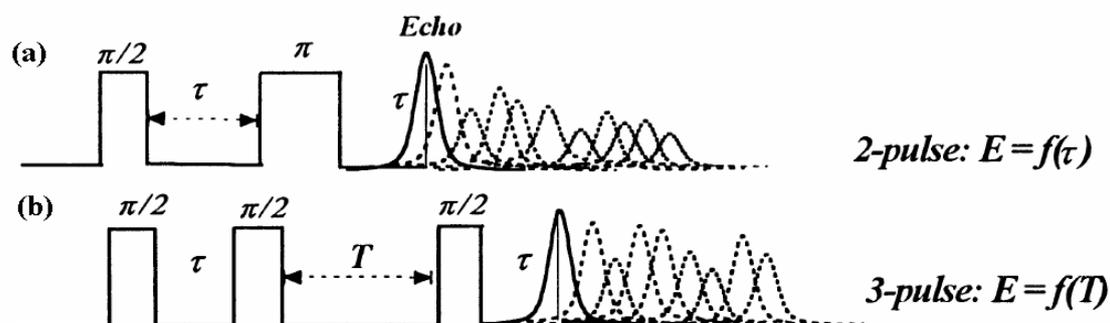
Em experimentos típicos de ESEEM são usadas as seqüências de dois pulsos do eco de Hahn (Figura A4a) ou a seqüência de três pulsos do eco estimulado (Figura A4b). No caso de dois pulsos, a amplitude do eco de spin é medida em função da separação  $\tau$  entre os dois pulsos. A amplitude do eco é modulada pela frequência das transições nucleares. Além dessas, a soma e a diferença das frequências das transições nucleares também são obtidas nos experimentos de ESEEM a dois pulsos e, freqüentemente, o curto tempo de relaxação spin-spin faz com que a amplitude do ESE decaia após algumas poucas

centenas de nanosegundos, fazendo com que a resolução fique restrita a transições em baixa frequência. Felizmente, tempos de relaxação spin-spin curtos não afetam o experimento de ESEEM a três pulsos, no qual a amplitude do eco estimulado é medida em função do tempo de separação  $T$  entre o segundo e o terceiro pulsos. Ainda, apenas as frequências fundamentais das transições nucleares são observadas nesse caso, apesar de suas amplitudes dependerem do valor da separação  $\tau$  entre os dois primeiros pulsos. Para uma caracterização completa dos efeitos observados em ESEEM, normalmente são realizados o experimento a dois pulsos e mais uma série de medidas a três pulsos para diferentes valores de  $\tau$ .

Na figura A4a, pode-se observar que o decaimento do eco não é monotônico, mas sim modulado por uma função claramente periódica. Uma explicação qualitativa pode ser dada para esse fato ao considerarmos a precessão dos núcleos que estão nas vizinhanças dos spins eletrônicos. Tal precessão dá origem a variações do campo local visto pelos elétrons, adiantando ou atrasando a fase dos mesmos de acordo com o estágio alcançado pelo ciclo de precessão nuclear. Assim, um efeito de interferência ocorre e, em geral, tende a diminuir a amplitude do eco. Entretanto, se o tempo  $\tau$  entre os pulsos compreender um ciclo de precessão nuclear completo, os ângulos de atraso e adiantamento irão se compensar fazendo com que a amplitude do eco tenha seu valor máximo.

Esse modelo simples falha para núcleos com spin maior que  $\frac{1}{2}$  e é insuficiente para o cálculo exato da função que modula o decaimento do envelope do eco. Um cálculo completo envolve a utilização do formalismo de matriz densidade, onde toda a história de transições permitidas e “semi-proibidas” é seguida e as fases apropriadas são obtidas. Os resultados podem ser derivados em

geral para um spin nuclear  $I$ , com ou sem interações quadrupolares, acoplado a elétrons com spin  $S$  através de quaisquer tipos de processos (MIMS, 1972b).



**Figura A4.** Seqüências de pulsos. (a) ESEEM a 2 pulsos; (b) ESEEM a 3 pulsos. O envelope do ESE é gerado ao medirmos a amplitude do eco em função da separação entre pulsos. Para a seqüência de 2 pulsos, o intervalo de separação é o tempo  $\tau$  entre os pulsos, enquanto que no experimento a 3 pulsos, o intervalo  $T$  entre o segundo e o terceiro pulso é variado e  $\tau$  é mantido constante. Em ambos os casos, o espectro no domínio das freqüências é obtido por transformada de Fourier dos decaimentos no domínio temporal (adaptado da Ref. ROWAN, 1965).

### II. 3. Avanços e Aplicações Recentes em ESEEM

Dentre os objetivos principais da técnica de ESEEM está o aumento da resolução de linhas espectrais, simplificando a interpretação de espectros e sendo uma ferramenta bastante útil para a medida de acoplamentos entre spins nuclear e eletrônico e o seu uso extensivo, no estudo do ambiente em torno de íons metálicos presentes na estrutura de diversas proteínas.

Íons metálicos desempenham uma série de papéis na função de proteínas, o mais importante sendo o aumento da estabilidade estrutural da mesma na conformação necessária para o desempenho da respectiva função biológica e/ou a participação em processos catalíticos (LIPPARD e BERG, 1994; HOLM *et al.*, 1996). As cadeias laterais de aminoácidos ligantes de metal contêm, em geral, grupos

carboxílicos (ácido aspártico e glutâmico), imidazol (histidina), indol (triptofano), tiol (cisteína), tioeter (metionina), hidroxil (serina, treonina e tirosina) e amida (asparagina e glutamina). Prótons ( $^1H$ ,  $I=1/2$ ) e nitrogênios ( $^{14}N$ ,  $I=1$ ) são os únicos núcleos presentes naturalmente na estrutura de proteínas e que podem contribuir para o sinal de ESEEM; outros núcleos com spin nuclear diferente de zero têm abundância natural muito baixa ( $^{13}C$ ,  $^{17}O$ ) e sua contribuição é muito difícil de ser resolvida. Além disso, núcleos com  $I=1$  e acoplamentos hiperfinos fracos ou moderados são, particularmente, apropriados para estudo via ESEEM, pois permitem a mistura de estados necessária para induzir as transições nucleares “semi-proibidas”.

Dentre as aplicações recentes de ESEEM a metaloproteínas, podemos citar:

- determinação do número de núcleos acoplados ao centro paramagnético (KEVAN e KISPERT, 1976), como no caso de grupos imidazol acoplados a íons de Cu(II) no complexo Cu(II)-dietilenotriamina (MCCRACKEN *et al.*, 1988);
- a comparação entre espectros de ESEEM obtidos com amostras contendo  $^{14}N$  e com aquelas marcadas seletivamente em uma certa posição com  $^{15}N$  permite a determinação de modulações pertinentes, levando a uma melhor resolução, e tem contribuído com importantes informações estruturais como no caso de mioglobina e porfirinas (MAGLIOZZO e PEISACH, 1992), de amino oxidases contendo Cu(II) (MCCRACKEN, 1992) e de transferrina (SNETSIGER *et al.*, 1992).
- espectros de ESEEM de xantina oxidase (CAMMARK *et al.*, 1991) e de 2Fe-2S (ferredoxina de *C. pasteurianum* (SHERGILL *et al.*, 1996) mostraram um acoplamento fraco com nitrogênios de grupamentos amida,

similarmente ao que foi encontrado em ferredoxinas de planta. Isso implica que não há nenhum núcleo de nitrogênio diretamente acoplado nesses clusters, mas que pontes de hidrogênio do tipo NH-S são prováveis. A troca por  $^2H_2O$  mostrou que os clusters têm grande acessibilidade ao solvente;

- identificação e caracterização de sítios de ligação de Cu(II) no domínio N-terminal da proteína prion (PrP) (ARONOFF-SPENCER *et al.*, 2000);
- estudos de RPE-CW e ESEEM determinaram a presença de íons Mn(II) em várias lectinas da sub-tribo Diocleinae, estando tais íons coordenados ao nitrogênio de um grupamento imidazol. ESEEM também mostrou a presença de duas moléculas de água em todas as lectinas estudadas nesse caso (LEE *et al.*, 2000);

ESEEM de núcleos de  $^{15}N$  e  $^{31}P$  em complexos de Mn(II)-GDP da proteína ligantes de guanina N-*ras* p21 marcados seletivamente com  $^{15}N$  nas posições amida dos aminoácidos serina e glicina permitiram a determinação da distância entre o íon Mn(II) e os núcleos  $^{15}N$  e  $^{31}P$ , com o valor final em excelente acordo com aquele obtido por técnicas de raios-X (LARSEN *et al.*, 1992); Estudo da evolução de complexos de oxigênio no fotosistema II (ZIMMERMANN *et al.*, 1993) e a caracterização de radicais intermediários em amino oxidases contendo íons Cu (SNETSIGER *et al.*, 1992) tem sido estudados pela ESEEM. Várias outras aplicações de ESEEM podem ser encontradas nas revisões recentes de DELIGIANNAKIS *et al.*, 2000 e CAMMACK *et al.*, 1991, ou naquelas mais tradicionais escritas por MIMS e PEISACH, 1981.

### III. Referências

ARONOFF-SPENCER, E.; BURNS, C.S.; AVDIEVICH, N.I.; GERFEN, G.J.; PEISACH, J.; ANTHOLINE, W.E.; BALL, H.L.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B.; MILHAUSER, G.L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. **Biochemistry**, n. 39, p. 13760-13768, 2000.

CAMMARK, R.; CHAPMAN, A.; PEISACH, J.; McCRACKEN, J. Electron spin-echo spectroscopy of the iron-sulphur clusters of xanthine oxidase from milk. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, n. 87, p. 3203-3211, 1991.

CAMMACK, R.; GAY, E.; SHERGILL, J.K. Studies of hyperfine interactions in [2Fe---2S] proteins by EPR and double resonance spectroscopy. **Coord. Chem. Rev.**, n. 1003 p. 190-192, 1999.

DELIGIANNAKIS, Y.; LOULUDI, M.; HADJILIADI, N. Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as a tool to investigate the coordination environment of metal centers. **Coord. Chem. Rev.**, n. 204, p. 102-195, 2000.

DIKANOV, S.A.; TSVETKOV, Y.D. **Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy**, CRC Press, Boca Raton, 1992.

DRAGO, R.S. **Physical Methods for Chemists**. Mexico: Saunders College Publishing, 1992.

FEHER, G. Observation of Nuclear Magnetic Resonances via the Electron Spin Resonance Line **Phys. Rev.**, n. 103, p. 834-842, 1956.

FEHER, G. **Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology**. New York: Gordon and Breach, 1969.

HOLM, R.H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E.I. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures, **Chem. Rev.**, n. 96, p. 2239-2243, 1996.

KEVAN, L.; KISPERS, L.D. **Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy**. New York: Wiley, 1976.

LARSEN, R.G.; HALKIDES, C.J.; REDFIELD, A.G.; SINGEL, D.J. Electron Spin-Echo Envelope Modulation Spectroscopy of Mn<sup>2+</sup>\*GDP Complexes of N-ras p21 with Selective <sup>15</sup>N Labeling **J. Am. Chem. Soc.**, n.114, p. 9608-9615, 1992

LEE, H.C.; GORONCY, A.K.; PEISACH, J.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; SAMPAIO, A.H.; DAM, T.K.; BREWER, C.F. Demonstration of a Conserved Histidine and Two Water Ligands at the Mn<sup>2+</sup> Site in Diocleinae Lectins by Pulsed EPR Spectroscopy. **Biochemistry**, n. 39, p. 2340-2352, 2000.

LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**, University Science Books, Mill Valey, 1994.

LOWRY, T.; RICHARDSON, K. S. **Mechanism and Theory in Organic Chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Harper Collins Publishers, 1987, p.985.

MAGLIOZZO, R.S.; PEISACH, J. Electron Spin Echo Envelope Modulation Spectroscopic Study of Iron-Nitrogen Interactions in Myoglobin Hydroxide and Fe( III) Tetraphenylporphyrin Models. **Biochemistry**, n. 31, p. 189-196, 1992;

MCCRACKEN, J.; PEMBER, S.; BENKOVIC, S.J.; VILLAFRANCA, J.J.; MILLER, R.J.; PEISACH, J. **J. Am. Chem. Soc.**, n.110, p. 1069-1074, 1988.

MCCRACKEN, J.; PEISACH, J.; COTE, C.E.; MCGUIRI, M.A.; DOOLEY, D.M. Pulsed EPR Studies of the Type 2 Copper Binding Site in the Mercury Derivative of Laccase. **J. Am. Chem. Soc.**, n. 114, p. 3715-3725, 1992.

MIMS, W.B.; GESHWIND, S. **Electron Paramagnetic Resonance**, Plenum Press, New York, p. 263-285, 1972a.

MIMS, W.B. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments **Phys. Rev.**, n. 5, p. 2409-2420, 1972b.

MIMS, W.B.; PEISACH, J. em: L.J. Berliner (Ed.), **Biological Magnetic Resonance**, vol. 3 Plenum, New York, p. 213-263, 1981.

PORTER, G.; NORRISH, R.G.W. Flash photolysis and spectroscopy: A new method for the study of free radical reactions. **Nature**, n. 164, p. 658-668, 1949.

ROWAN, L.G.; HAHN, E.L.; MIMS, W.B. Electron-Spin-Echo Envelope Modulation. **Phys. Rev.**, n. 137, p. 61-68, 1965.

SHERGILL, J.K.; GOLINELLI, M.P.; CAMMACK, R.; MEYER, J. Coordination of the [2Fe-2S] Cluster in Wild Type and Molecular Variants of *Clostridium pasteurianum*

Ferredoxin, Investigated by ESEEM Spectroscopy. **Biochemistry**, n. 35, p. 12842-12844, 1996.

SNETSIGER, P.A.; CHASTEEN, N.D.; CORNELIUS, J.B.; SINGEL, D.J. Static properties of one-dimensional generalized Landau liquids. **J. Phys. Chem.**, n. 96, p. 7917-7921, 1992.

TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. California: University Science Books, 1991.

ZIMMERMANN, J-I; BOUSSAC, A.; RUTHERFORD, A.W. The Manganese Center of Oxygen-Evolving and Ca<sup>2+</sup> Depleted Photosystem II: A Pulsed EPR Spectroscopy Study. **Biochemistry**, n. 32, p. 6265-6272, 1993.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)