Haloperoxidases de vanádio – enzimas muito versáteis

FILIPPE ANDRÉ NATÁLIO¹, MARISA NICOLAI¹,
MARISE ALMEIDA^{1,2}, MADALENA HUMANES¹

Resumo

Haloperoxidases de vanádio (V-HPO) são enzimas que catalisam uma diversidade substancial de reacções, desde a halogenação à sulfoxidação, sendo operacionais numa gama alargada de temperaturas e em misturas solvente orgânico-água. Na sua forma apo apresentam actividade de fosfatases. A inversa é, nalguns casos, verdadeira

– certos fosfatases, quando incubados com vanadato, apresentam actividade halogenante e/ou sulfoxidante. Embora o grau de homologia global existente entre os vários enzimas não seja muito elevado, a excepção é o centro activo cuja semelhança é muito grande. A reactividade destes enzimas é discutida com base em dados estruturais e em dados de mutações, efectuadas nos centros activos e nas suas vizinhanças.

Introdução

Haloperoxidases são enzimas produzidos por muitos sistemas biológicos que catalisam a oxidação de halogenetos (cloreto, brometo e iodeto) pelo peróxido de hidrogénio.

Na alga *Penicillium capitatus* foi encontrado o primeiro haloperoxidase de que há registo para o meio marinho, verificando tratar-se de um enzima hémico [1]. Mas, outros haloperoxidases tinham sido já descobertos, como por exemplo, no fungo *Caldariomyces fumago* [2], nos leucócitos [3], nos eosinófilos [4] e no leite [5].

Durante muito tempo pensou-se que todos os haloperoxidases eram enzimas hémicos [6] mas, no início dos anos 80, foi descoberto o primeiro haloperoxidase de vanádio na alga castanha *Ascomyllum nodosum* [7]. Seguidamente, foi demonstrado que o vanádio se encontrava no grupo prostético dos haloperoxidases de várias algas castanhas

[8-10]. Desde então a presença de haloperoxidases de vanádio foi detectada em outros organismos como nas algas vermelhas, *Ceramium rubrum* [11], *Corallina pilulifera* [12] e em fungos terrestres como *Curvularia inaequalis* [13].

Na costa portuguesa várias espécies de algas da ordem Laminariales, (*Saccorhiza polyschides*, *Phyllariopsis brevipes*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria ochroleuca*) e da ordem Fucales (*Pelvetia canaliculata*, *A. nodosum*) apresentam haloperoxidases de vanádio [14-17].

Os haloperoxidases de vanádio apresentam-se frequentemente como agregados de monómeros de massa molecular 65-70 kDa [13] ou em estruturas homodiméricas, como o haloperoxidase de vanádio da *A. nodosum*, em que a massa molecular é cerca de 120 kDa [18] ou ainda em estruturas dodecaméricas de iguais subunidades, como é o caso do haloperoxidase da *C. officinalis* [19].

Uma característica interessante destes enzimas é a sua notável estabilidade operacional. Estes enzimas podem reter a sua actividade, durante cerca de um mês, quando armazenados em 60% de metanol, etanol e isopropanol e permanecem totalmente activos quando expostos a temperaturas até 70 °C por períodos de tempo relativamente longos [8, 20]. No nosso laboratório observámos que estes enzimas, quando liofilizados, permaneceram mais de 6 meses, à temperatura ambiente, sem perda de actividade.

Os haloperoxidases podem distinguir-se, com base no seu grupo prostético, em haloperoxidases hémicos, que contêm o ferro ligado a uma protoporfirina IX ou derivado e os haloperoxidases não hémicos onde se incluem os haloperoxidases de vanádio [21]. Uma propriedade geral dos haloperoxidases de vanádio é o facto de o vanádio, na forma de oxoanião, poder ser removido por diálise contra EDTA, em tampão citrato-fosfato a

1-Centro de Química e Bioquímica - Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Edifício C8, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

2-Instituto de Tecnologia Biomédica, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

baixo pH (3,8), levando à inactivação do enzima. A actividade enzimática pode, contudo, ser completamente restabelecida por adição de vanadato [22].

Os haloperoxidasas de vanádio podem ser também classificados segundo o halogeneto mais electronegativo que são capazes de oxidar. Assim, um cloroperoxidase pode oxidar cloreto, brometo e iodeto, enquanto que um bromoperoxidase pode oxidar brometo ou iodeto e um iodoperoxidase pode oxidar apenas o iodeto, embora a distinção entre estas subclasses não seja, por vezes, muito clara.

Estrutura dos haloperoxidasas de vanádio

Até ao momento foram publicadas as estruturas de raios-X de apenas três haloperoxidasas contendo vanádio.

Bromoperoxidase de vanádio (V-BPO) da alga *A. nodosum*

As estruturas primária e tridimensional do V-BPO (EC 1.1.11.X) extraído da alga *A. nodosum* revelaram tratar-se de uma proteína homo-dimérica com 1111 aminoácidos de forma aproximadamente elipsoidal. Os dois monómeros estão ligados por duas pontes dissulfureto intermoleculares. A sequência primária (SwissProt access code 1Q19) do V-BPO foi estabelecida combinando os resultados de sequenciação de DNA e de proteína com a interpretação dos mapas de densidade electrónica. O holoenzima contém um átomo de vanádio, numa estrutura de bipirâmide trigonal, em cada um dos dois centros activos (Figura 1) [23].

No estado nativo o átomo de vanádio encontra-se no centro de uma bipirâmide trigonal, com três átomos de oxigénio coordenados no plano equatorial; as cargas negativas destes átomos de oxigénio são compensadas por ligações de hidrogénio a vários aminoácidos da vizinhança, positivamente carregados e com carácter hidrofílico, os quais incluem Lys³⁴¹, Arg³⁴⁹, Ser⁴¹⁶, Gly⁴⁷¹ e Arg⁴⁸⁰. O oxigénio axial forma uma ligação de hidrogénio com o átomo N^{δ1} da histidina distal His⁴¹⁸ e uma ligação covalente com o átomo N^{δ2} da His⁴⁸⁶.

Figura 1 Estrutura do centro activo do bromoperoxidase de vanádio (V-BPO) da alga *A. nodosum* [23]. Linhas verdes a tracejado indicam ligações de hidrogénio. A figura foi preparada e modelada utilizando o programa Swiss PDB Viewer®.

Estes resultados estão em concordância com os dados espectroscópicos e cinéticos que estabelecem a presença de um resíduo de histidina no centro activo do V-BPO [24].

A estrutura do V-BPO tem ainda uma segunda histidina próxima do centro activo (His⁴¹¹) a qual, através de reacções de protonação/desprotonação modifica as propriedades catalíticas do enzima.

Locais de ligação específica para substratos orgânicos aromáticos (como o indole ou monoclorodimedona, por exemplo) ou para halogenetos, não são visíveis nesta estrutura.

Cloroperoxidase de vanádio (V-CPO) do fungo *C. inaequalis*

O gene que codifica o V-CPO de *C. inaequalis* foi sequenciado, correspondendo a uma proteína de 609 aminoácidos. Tanto a estrutura primária [25] como a estrutura de raios-X do V-CPO de *C. inaequalis* foram determinadas [26].

A forma global deste V-CPO monomérico é cilíndrica. O empacotamento compacto das hélices resulta num efeito hidrofóbico que é, provavelmente, o maior responsável pela estabilidade deste enzima.

Da estrutura cristalina da cloroperoxidase de *C. inaequalis* [26] verifica-se que o

Figura 2 Representação esquemática do centro activo do cloroperoxidase de vanádio (V-CPO) do fungo *C. inaequalis* [30]. Linhas verdes a tracejado indicam ligações de hidrogénio. A figura foi preparada e modelada utilizando o programa Swiss PDB Viewer®.

Figura 3 Estrutura do centro activo de uma das subunidades do bromoperoxidase de vanádio (V-BPO) da alga *C. officinalis* [23]. Linhas a verde e a tracejado indicam ligações de hidrogénio. A figura foi preparada e modelada utilizando o programa Swiss PDB Viewer®.

lão vanadato está ligado covalentemente ao átomo N^{δ2} da histidina proximal (His⁴⁹⁶), na posição apical, formando uma estrutura de bipirâmide trigonal. A carga negativa dos átomos de oxigénio é compensada, também aqui, pelos resíduos de carga positiva dos aminoácidos da vizinhança, que incluem Lys³⁵³, Arg³⁶⁰, Ser⁴⁰², Gly⁴⁰³ e Arg⁴⁹⁰ (Fig. 2).

O quarto oxigénio situa-se no vértice superior da pirâmide, na forma de grupo hidroxilo, o qual forma uma ligação de hidrogénio com o átomo de azoto N^{δ1} da His⁴⁰⁴ distal.

Bromoperoxidase de vanádio da alga *C. officinalis*

O bromoperoxidase da alga *C. officinalis* apresenta-se numa forma dodecamérica, com doze subunidades idênticas, num arranjo invulgar de simetria, com uma cavidade central formada pelos átomos de azoto terminais de cada subunidade [27]. A estrutura do centro activo de cada subunidade encontra-se na Figura 3. As subunidades, por sua vez, interactivam duas a duas, com um enrolamento e uma organização semelhantes aos dímeros do enzima da alga *A. nodosum*, com o qual tem cerca de 33% de homologia.

Figura 4 Sobreposição da estrutura dos centros activos dos três haloperoxidasas de vanádio: Verde – *C. inaequalis*; Vermelho – *A. nodosum*; Azul – *C. officinalis*. A figura foi preparada e modelada utilizando o programa Swiss PDB Viewer®.

Comparação do centro activo das haloperoxidasas vanádio – aproximação catalítica

Embora a comparação das estruturas tridimensionais do V-CPO do fungo *C. inaequalis* e das V-BPO das algas *A. nodosum* e *C. officinalis* (Figura 4), revele que os centros activos são estruturalmente idênticos, a homologia entre as sequências dos VBPO e do V-CPO é baixa (aproximadamente 21.5%).

Na estrutura do centro activo do V-BPO da *A. nodosum*, o resíduo catalítico His⁴¹⁸ corresponde à His⁴⁰⁴ no V-CPO. Uma segunda histidina (His⁴¹¹), próxima do centro activo do V-BPO da *A. nodosum* pode alterar o potencial redox do intermediário peroxo, por reacções de protonação/desprotonação. Este resíduo (His⁴¹¹) está também envolvido na estabilização dos átomos de oxigénio do grupo prostético, mas não se encontra no V-CPO. Por outro lado, o aminoácido Phe³⁹⁷ encontra-se exclusivamente no V-CPO. Colocou-se a hipótese, de que esta diferença nos aminoácidos, possa ser responsável pela diferença na actividade de oxidação observada [28], uma vez que as cadeias laterais hidrofóbicas de Trp³⁵⁰ e Phe³⁹⁷ no V-CPO podem fornecer um ambiente estabilizador dos halogenetos e actuar como um ponto de ancoragem para estes. Também o resíduo Ser⁴⁰², presente exclusivamente no V-CPO da *C. inaequalis*, na proximidade do grupo prostético, é um candidato provável para este efeito.

Nas três estruturas cristalográficas de V-HPO publicadas, todos os resíduos envolvidos na ligação ao vanadato se mantêm, mas apenas cinco dos 17 resíduos que delimitam a cavidade do centro activo são mantidos entre os dois V-BPO e nenhum destes cinco resíduos se encontra estruturalmente conservado no V-CPO. Nos V-BPO existe uma His⁴⁷⁸ que está localizada na posição da Phe³⁹⁷ que é proposta para a ligação do cloreto ao centro activo da V-CPO. Esta substituição, em conjunto com a ligação de hidrogénio da Asp³³³(Asp²⁷⁰) à His⁴⁸⁵ (His⁴¹⁸) constitui a base da explicação para a preferência do brometo face ao cloreto. Na verdade, estes dois resíduos estão conservados nas V-BPO.

Os resíduos envolvidos na ligação do vanadato estão conservados nestes três haloperoxidasas. Contudo, a maioria dos outros resíduos que formam a cavidade do centro activo são diferentes, o que se pode traduzir em diferenças de especificidade de substratos e estereoselectividade das reacções catalisadas por estes enzimas.

Relação evolutiva entre V-HPO e fosfatases

Apesar da homologia entre o V-BPO de *A. nodosum* e o V-CPO de *C. inaequalis* ser muito baixa, há alguns resíduos, em três domínios específicos, que são também conservados em pelo menos duas classes de fosfatases: os fosfatases de membrana e os fosfatases ácidos segregados [29].

A estrutura cristalina e as sequências primárias do fosfatase ácido não específico de *Escherichia blattae* [30] e do V-CPO de *C. inaequalis* [25] mostram uma grande similaridade nos centros activos, pondo a hipótese de os haloperoxidasas de vanádio e as várias classes de fosfatases ácidos terem evoluído de um mesmo antecendente [29]. Foi surpreendente descobrir que a forma apo do cloroperoxidase de vanádio apresenta actividade catalítica como fosfatase, mediando a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato [29]. Os dados cinéticos da reacção de fosfatase catalizada pelo apocloroperoxidase de vanádio apontam para um mecanismo com a formação de um intermediário enzimático fosforilado. É importante salientar que os fosfatases ácidos, com um grau de homologia elevado com o V-CPO de *C. inaequalis*, nos quais foi incorporado vanadato, revelam actividade de oxidação do brometo e promovem reacções enantio-selectivas de transferência de oxigénio, com bons rendimentos [31, 32]. Curiosamente, a incorporação de vanadato num fitase extraída do *Aspergillus ficuum* e num fosfatase ácido extraído do germén de trigo, não homólogos ao V-HPO, permitem a estas enzimas catalisarem reacções de transferência enantio-selectiva de oxigénio [33].

Figura 5 Esquema básico do mecanismo de oxidação do halogeneto por acção do cloroperoxidase de vanádio do fungo *C. inaequalis* [39].

Aspectos mecanísticos das reacções de halogenação

Mecanismo catalítico geral das haloperoxidasas

Os haloperoxidasas são enzimas que oxidam halogenetos a ácidos hipo-halosos, à custa do peróxido de hidrogénio (ou outro peróxido):

em que $X^- = Cl^-, Br^-, I^-$ (ou o pseudo halogeneto SCN^-) [34].

Na presença do peróxido de hidrogénio, através de uma transferência de dois electrões, produz-se o intermediário ácido hipo-haloso, muito reactivo e que pode prosseguir a reacção, se estiver presente um aceitador nucleófilo (HA), para formar um vasto leque de compostos halogenados, como se esquematiza na seguinte reacção:

Na ausência de um composto aceitador (HA), verifica-se um processo designado por disproporção assistida por halogeneto – o ácido hipo-haloso pode ser reduzido por um equivalente adicional de peróxido de hidrogénio, produzindo-se oxigénio molecular singlete [35, 36]

Apesar da diversidade de produtos halogenados formados, apenas três classes de enzimas halogenantes (haloperoxidasas, halogenases dependentes de FAD_2 e metilo-transferases) parecem estar envolvidos na biossíntese de compostos orgânicos halogenados [37]. Pensa-se que a secreção destes metabolitos halogenados, que exibem muitas vezes uma actividade biológica considerável, pode estar ligada, directa ou indirectamente, aos mecanismos de defesa dos organismos [38].

O mecanismo proposto para a actualização catalítica dos haloperoxidasas de vanádio é um mecanismo do tipo *ping-pong* [35, 36], onde o primeiro substrato (H_2O_2) se liga ao enzima, formando o peroxocomplexo com libertação do primeiro produto (H_2O), antes da ligação e oxidação do segundo substrato ($X^- =$ halogeneto). Embora os parâmetros cinéticos sejam diferentes, os estudos cinéticos com os vários enzimas parecem apontar para um mecanismo semelhante nas reacções de oxidação do halogeneto (cloreto e brometo) catalisadas pelas cloro- e bromoperoxidasas de vanádio (Figura 5).

Ciclo catalítico

Uma característica interessante destes enzimas é o facto do estado de oxidação do vanádio se manter inalterado duran-

Figura 6 Comparação de algumas estrutura do centro activo: (A) cloroperoxidase de vanádio de *C. inaequalis*, (B) mutante V-CPO His⁴⁰⁴Ala e (C) mutante Ly³⁵³Ala. Linhas verdes a tracejado indicam ligações de hidrogénio. A figura foi preparada e modelada utilizando Swiss PDB Viewer[®].

te todo o ciclo catalítico, ao contrário do que se verifica nas haloperoxidases hémicas.

Durante o ciclo catalítico e para o caso do V-CPO do *C. inaequalis*, o grupo prostético (HVO_4^{3-}) está coordenado ao átomo N^{δ2} da His⁴⁹⁶. O peróxido liga-se, através dos dois átomos de oxigénio, ao átomo de vanádio. Assim, a geometria de coordenação em torno do átomo de vanádio passa a apresentar-se como uma pirâmide tetragonal distorcida. Inicialmente, foi proposto que o ião halogeneto se ligaria directamente ao vanadato; todavia o isolamento de um intermediário peroxo, aliado ao facto de que a ligação halogeneto-vanadato baixaria a sua nucleofilicidade, o que não se verifica, inviabilizaram esta hipótese [39].

As estruturas cristalinas, quer do enzima nativo quer do intermediário peroxo, no V-CPO, permitiram observar que o resíduo de aminoácido Lys³⁵³ está ligado por uma ponte de hidrogénio ao oxigénio do grupo prostético. Esta interacção parece ser muito importante para a coordenação do peróxido ao vanádio (V), labilizando um oxigénio equatorial do grupo prostético, facilitando, concomitantemente, o ataque nucleofílico do halogeneto, por polarização do peróxido coordenado [35, 36].

No V-BPO, o aminoácido correspondente (Lys³⁴¹) e o aminoácido adicional His⁴¹¹ podem estar envolvidos na ligação do peróxido ao vanádio e também na activação do peróxido coordenado [37].

Mutagénesse do V-CPO: uma aproximação ao mecanismo catalítico

Afim de investigar a função específica dos aminoácidos do centro activo na actividade catalítica do V-CPO do fungo *C. inaequalis*, o enzima foi expresso através de um sistema heterólogo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* tendo sido produzidos mutantes, através de mutagénesse dirigida [39, 40]. O cloroperoxidase de vanádio recombinante (rv-CPO) é reactivado por adição de vanadato e, quando comparado com o produzido naturalmente, apresenta um comportamento cinético semelhante. A estrutura cristalina mostra que a estrutura global do enzima permanece praticamente inalterada, particularmente, na vizinhança do centro activo [39].

Foram efectuadas experiências de mutagénesse dirigida sobre diversos resíduos do centro activo, mutando-os para alaninas. Nesta cavidade, existe um grande número de interacções, essencialmente ligações de hidrogénio, que envolvem as cadeias laterais dos aminoácidos que a revestem. A substituição de resíduos de aminoácidos, com cadeias laterais gran-

des, por grupos metilo de uma alanina, não parece provocar mudanças estruturais no local de ligação do vanádio, com excepção do mutante His⁴⁰⁴Ala que sofre algumas modificações estruturais (Fig. 6).

Demonstraram-se alguns efeitos estruturais, não muito significativos, nas mutações do resíduo Arg³⁶⁰, que está directamente envolvido na compensação da carga negativa de um dos oxigénios do vanadato, e também no resíduo Asp²⁹², que está envolvido na formação de uma ponte salina com o aminoácido Arg⁴⁹⁰ e que, por sua vez, também interactua com o grupo prostético. Contudo, é relevante salientar que se verifica uma diminuição da actividade como haloperoxidase devido, provavelmente, à desestabilização da rede de interacções existentes na cavidade e que contribuem para a formação do peroxocomplexo.

O enzima perde igualmente a sua capacidade de oxidar o cloreto quando a His⁴⁰⁴ distal é substituída por uma alanina (mutante His⁴⁰⁴Ala), mostrando assim que este resíduo desempenha um papel importante na estabilização do grupo hidroxilo apical [23].

No mutante His⁴⁹⁶Ala, apesar de não se verificarem modificações estruturais, esta alteração resulta num enzima inactivo, devido à falta de capacidade do

enzima ligar, neste caso, o grupo prostético, demonstrando assim a importância essencial da ligação do vanadato ao átomo N^{δ2} da His⁴⁹⁶.

Recentemente foram efectuados outros estudos utilizando mutagenese dirigida nos aminoácidos do centro activo Ser⁴⁰² e Phe³⁹⁷ do cloroperoxidase da *C. inaequalis*.

Coloca-se então a hipótese de que estes aminoácidos possam marcar a diferença entre a capacidade oxidativa de halogenetos entre o V-BPO de *A. nodosum* e o V-CPO de *C. inaequalis*. A substituição de Phe³⁹⁷ por uma histidina no V-CPO, utilizando a mutagenese dirigida, mostra que a actividade de cloração se mantém, embora diminuída. Apesar disso, este mutante ainda apresenta maior actividade de bromação do que o V-BPO de *A. nodosum* [41].

Por outro lado, estudos de EXAFS no V-BPO sugerem que o resíduo Ser⁴⁰² pode ter um papel importante na catálise, ligando o halogeneto, de forma covalente, ao grupo hidroxilo do aminoácido [42]. No entanto, resultados recentes demonstram que a mutação da Ser⁴⁰² do V-CPO tem um efeito diminuto na actividade catalítica (resultados não publicados). A estrutura dos mutantes demonstra que o centro activo deste cloroperoxidase é uma matriz rígida, que fornece um local de ligação a um oxoanião. Embora a

Figura 7 Reacção de transferência de oxigénio em sulfuretos, catalisada pelo V-HPO. Imagem concebida utilizando o programa ChemUltra 9.0®.

capacidade de oxidação do cloreto ou brometo não possa ser especificamente atribuída a um resíduo aminoácido ela é, muito provavelmente, determinada por uma relação sinérgica entre vários resíduos e não por um só.

Reacções de sulfoxidação

A adição de um átomo de oxigénio a um centro de enxofre, dentro de um composto orgânico formando uma ligação polarizada S-O, não só altera as propriedades físicas e químicas da molécula, mas pode também alterar profundamente a actividade biológica, a sua distribuição dentro do organismo e a sua forma de degradação.

Os sulfóxidos opticamente activos, são bastante conhecidos como ferramentas na síntese orgânica, devido à sua elevada indução assimétrica, o que pode ser atribuído a diferenças espaciais e estéricas entre os substituintes e a esta-

bilidade conformacional dos sulfuretos [43-49].

A utilização de peroxocomplexos de vanádio (V) em reacções de oxidação tem sido investigada desde há várias décadas. Em 1986, foi sintetizado um peroxocomplexo, usando uma base de Schiff tridentada e opticamente activa, o qual catalisou a oxidação de um sulfureto de metilfenilo pelo hidroperóxido de *t*-butilo em diclorometano, conduzindo à formação do enantiómero R do correspondente sulfureto, com um excesso enantiomérico de 14% [50]. Desde então, muitas outras reacções de oxidação, catalisadas por peroxocomplexos de vanádio (V), têm sido descritas [49-54].

O cloroperoxidase do fungo *C. fumago*, um haloperoxidase hémico, é, até à data, o haloperoxidase que produz a mais elevada enantioselectividade entre todos os haloperoxidasas (hemi-

Figura 8 Proposta de possíveis mecanismos de transferência de oxigénio em peroxocomplexos de vanádio na presença de sulfuretos. R1 e R2 descrevem possíveis cadeias/grupos associadas ao átomo de enxofre. Imagem concebida utilizando o programa ChemUltra 9.0®.

cos e de vanádio) estudados até agora [32, 43, 44, 49, 55, 56].

Alguns autores, atribuem este facto, à presença de um resíduo do aminoácido

Foi já referida a relação evolucionária e semelhanças entre os centros activos dos fosfatases e haloperoxidases de vanádio. Para o confirmar, a um fita-se extraído do *Aspergillus ficuum*, (não

génio, que diminui consideravelmente o rendimento e o excesso enantiomérico dos sulfóxidos produzidos enzimaticamente [32, 48].

Mecanismo catalítico da transferência de oxigénio

Na sulfoxidação catalisada por peroxo-complexos inorgânicos de vanádio, a oxidação dos sulfuretos aos correspondentes sulfóxidos pode ser catalisada por um mecanismo de transferência de oxigénio que envolve um ataque electrofílico ou por um mecanismo de transferência de oxigénio nucleofílico (Figura 8) [57].

No mecanismo electrofílico, o processo de transferência de oxigénio envolve a transferência electrónica do peroxocomplexo de vanádio (V) activado, para um substrato electrofílico, sendo a reacção de oxidação mediada por um mecanismo radicalar [56, 58].

Na via nucleofílica, o substrato apresenta um comportamento nucleofílico, coordenando-se ao centro metálico, convertendo-o ao seu carácter original electrofílico, possibilitando o ataque nucleófilo pelo peróxido coordenado. Como os peroxocomplexos metálicos tendem a reagir através de um ataque nucleófilo, considerou-se que os sulfuretos se ligam ao peroxocomplexo de vanádio por um mecanismo de oxidação intramolecular, antes da transferência do oxigénio, favorecendo a via de transferência nucleofílica do oxigénio; no entanto, a coordenação do sulfureto parece pouco provável pois a sulfoxidação catalisada do vanádio (V) não é afectada pelo aumento da concentração do sulfureto ou por impedimentos estereoquímicos [32].

Reacções enzimáticas de transferência de oxigénio

A actuação dos enzimas é fortemente influenciada pela acessibilidade dos substratos ao centro activo e pela ocorrência de reacções não específicas de transferência electrónica, afectando deste modo a tão desejada enantioselectividade. A acessibilidade é regulada pela combinação de factores estéreo e electrónicos em consonância com a existência de factores de estabilização

Figura 9 Ciclo catalítico da sulfoxidação catalisado pelos haloperoxidases de vanádio. Imagem concebida utilizando o programa ChemUltra 9.0®.

glutamato, na posição distal, no lugar do resíduo de histidina, que se encontra na maioria dos haloperoxidases, quer hémicos, quer de vanádio [44].

Ten Brink *et al.* demonstraram que o V-BPO extraída das algas *A. nodosum* e *C. pilulifera* e o V-CPO do fungo *C. inaequalis* catalisavam a sulfoxidação do *p*-metiltioanisole (Fig. 7) [32].

O V-BPO extraído da alga *A. nodosum* apresenta a maior taxa de enantioselectividade, produzindo o sulfóxido do tioanisole com um excesso enantiomérico de 91%. Todavia, e embora a taxa de conversão para o V-CPO do *C. inaequalis* seja superior, o produto obtido é racémico [32].

homólogo dos V-HPO), foi incorporado vanádio no centro activo; este novo enzima é capaz de catalisar a sulfoxidação do tioanisole, embora com rendimento moderado e excesso enantiomérico reduzido [33].

No entanto, é importante salientar que, apesar do interesse existente nestas reacções, há ainda alguns impedimentos que condicionam a sua utilização, como por exemplo, a velocidade de reacção da maioria dos sulfuretos, biologicamente importantes, ser lenta devido, provavelmente, à baixa solubilidade dos sulfuretos em água ou ainda a existência de oxidação espontânea (não enzimática) dos sulfuretos com o peróxido de hidro-

como, por exemplo, as pontes de hidrogénio entre os aminoácidos das cadeias laterais na vizinhança do centro activo e do oxoanião (VO_4^{3-}).

Os mecanismos envolvidos nestas reacções de transferência de oxigénio diferem no caso da reacção envolver haloperoxidases hémicos ou de vanádio [44, 56, 58, 59].

Em termos mecanísticos, o primeiro passo da transferência de oxigénio nos processos de sulfoxidação pode ser comparada à formação do ácido hipohaloso: o peróxido liga-se ao átomo de vanádio lateralmente no plano equatorial, formando o peroxocomplexo [28]. Um dos átomos de oxigénio do peroxocomplexo tem uma carga parcial positiva e é vulnerável a um ataque nucleofílico pelo sulfureto (ou pelo halogeneto). É no segundo passo da reacção que os mecanismos divergem (Figura 8).

Para comprovar este mecanismo, foram realizadas experiências de marcação radioactiva do oxigénio e verificou-se que o oxigénio incorporado no sulfóxido provém, essencialmente, de peróxido marcado $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (95%), no caso do V-BPO de *A. nodosum*. A mesma experiência realizada com o cloroperoxidase de *C. inaequalis* demonstrou que o oxigénio incorporado provém da água (95%), o que parece confirmar que este cloroperoxidase tem características intermédias entre os haloperoxidases de vanádio e os haloperoxidases hémicos [56].

A oxidação de substratos, como halogenetos e sulfuretos, é descrita, para os haloperoxidases de vanádio, como um mecanismo de transferência de dois electrões enquanto que para os haloperoxidases hémicos a catálise da reacção de oxidação é feita através de um mecanismo monoelectrónico, em que o enzima, sob a forma de peroxocomplexo, retira um electrão ao sulfureto, oxidando-o e formando um sulfureto radicalar catiónico que é libertado para a solução (Figura 9).

A formação de um sulfureto radicalar foi já demonstrado para as reacções catalisadas por lactoperoxidase [33, 44].

Este radical difunde-se e reage com outras moléculas levando à formação de

Tabela 1 Reacções de sulfoxidação do tioanisole catalisadas por vários enzimas – excesso enantiomérico (ee) e rendimento.

Haloperoxidase	e.e. (%)	Rendimento
<i>Ascomphyllum nodosum</i>	85 (R)	55
<i>Coralina officinalis</i>	91 (S)	84
<i>Coralina pilulifera</i>	55 (S)	18
<i>Caldariomyces fumago</i>	>99 (R)	99.5

uma mistura racémica que é independente da concentração do enzima e do substrato.

Este passo tem lugar fora do centro activo e esta molécula radicalar reage, de forma aleatória, ora com outra molécula idêntica ora com moléculas de solvente ou oxigénio.

Mas, é igualmente possível que duas moléculas de sulfureto radicalar catiónicas possam reagir entre si para formar um sulfureto dicatiónico e uma molécula de sulfureto, sendo a reacção entre o dicatión e o solvente, neste caso a água, bastante provável [56, 59].

Apesar da existência de um mecanismo para a reacção de transferência de oxigénio, ainda não há uma justificação plenamente aceite para o facto dos V-BPO das algas *A. nodosum* e *C. officinalis* catalisarem enantio-selectivamente a formação do enantiómero R (superior a 91% [32] e 95% [43], respectivamente), enquanto que o VBPO da *C. pilulifera* apenas apresenta um excesso enantiomérico de 55% do enantiómero S (Tabela I) [32].

Este facto poderá dever-se a um baixo turnover, que traz como consequência um aumento da reacção não enzimática entre o peróxido de hidrogénio e o sulfureto levando a uma diminuição considerável da enantio-selectividade.

Conclusão

Os haloperoxidases de vanádio são os catalisadores da oxidação de halogenetos mais eficientes até à data encontrados. O mecanismo de catálise envolve a formação prévia de um peroxocomplexo.

As reacções são fortemente influenciadas pelos resíduos de aminoácidos do centro activo, que é muito semelhante nas três estruturas de haloperoxidases nativos até agora conhecidos. No entanto, a sua reactividade para alguns substratos, nomeadamente nas reacções de transferência de oxigénio, pode ser muito diversa, o que indicia um papel importante dos aminoácidos menos próximos do centro activo.

A homologia entre centros activos de alguns fosfatases e haloperoxidases abre também algumas hipóteses interessantes, em termos de mecanismos de regulação e biogénese, sobretudo de produtos halogenados com proveniência marinha.

Finalmente, a grande estabilidade e a reactividade destes compostos torna-os óptimos candidatos a biocatalisadores, em várias áreas farmacêuticas, em medicina nuclear e em oncomedicina.

Bibliografia

1. J. A. Manthey e L. P. Hager, *Journal of Biological Chemistry* **256** (1981) 11232-11238.
2. P. F. Hallenberg e L. P. Hager, *Methods in Enzymology* **52** (1978) 521-529.
3. G. C. Mills, *Journal of Biological Chemistry* **229** (1957) 189-197.
4. R. Wever, M. N. Hamera, R. S. Weening e D. Roos, *European Journal of Biochemistry* **108** (1980) 491-495.
5. M. Morrison, H. B. Hamilton e E. Stotz, *Journal of Biological Chemistry* **228** (1957) 767-776.

6. S. Ohtaki, H. Nakagawa, M. Nakamura e I. Yamazaki, *Journal of Biological Chemistry* **260** (1985) 1387-1390.
7. H. Vilter, *Phytochemistry* **23** (1984) 1387-1390.
8. H. Plat, B. E. Krenne e R. Wever, *Biochemistry Journal* **248** (1987) 277-279.
9. E. De Boer, Y. Van Kooyk, M. G. M. Tromp, H. Plat e R. Wever, *Biochimica and Biophysica Acta* **869** (1986) 48-53.
10. B. E. Krenn, Y. Izumi, H. Yamada e R. Wever, *Biochimica and Biophysica Acta* **998** (1989) 63-68.
11. N. Itoh, Y. Izumi e H. Yamada, *Biochemistry Biophysics Research Communications* **131** (1985) 428-435.
12. N. Itoh, Y. Izumi e H. Yamada, *Journal of Biological Chemistry* **261** (1986) 5194-5200.
13. J. W. van Schijndel, E. G. Vollenbroek e R. Wever, *Biochimica and Biophysica Acta* **1161** (1993) 249-256.
14. M. Almeida, M. Humanes, J. A. Silva, R. Melo e J. J. R. Fraústo da Silva, 'Plant peroxidases: Biochemistry and physiology', em C. Obinger, U. Burner, R. Eberman, C. Penel, H. Greppin (eds), University of Geneva (1996) 146-152.
15. M. Almeida, M. Humanes, J. A. Silva, R. Melo, J. J. R. Fraústo da Silva, H. Vilter e R. Wever, *Phytochemistry* **48** (1998) 229-239.
16. G. Almeida, M. Humanes, J. A. Silva, R. Melo, J. J. R. Fraústo da Silva e R. Wever, *Phytochemistry* **54** (2000) 5-11.
17. M. Almeida, S. Filipe, M. Humanes, M. F. Maia, R. Melo, N. Severino, J. A. L. da Silva, J. J. R. Fraústo da Silva e R. Wever, *Phytochemistry* **57** (2001) 633-642.
18. B. E. Krenn, H. Plat e R. Wever, *Biochimica and Biophysica Acta* **912** (1989) 287-291.
19. C. Rush, A. Willetts, G. Davies, Z. Dauter, H. Watson e J. Littlechild, *FEBS Letters* **359** (1995) 244-246.
20. E. De Boer, H. Plat, M. G. M. Tromp, R. Wever, M. C. R. Franssen, H. C. van der Plas, E. M. Meijer e H. E. Schoemaker, *Biotechnology and Bioengineering* **30** (1987) 607-610.
21. H. Vilter, *Biological Systems* **31** (1995) 325-362.
22. R. Wever, B. E. Krenn, E. De Boer, H. Offenberg e H. Plat, *Progress in Clinical Biological Research* **274** (1988) 477-493.
23. M. Weyand, H.-J. Hecht, M. Kieß, M.-F. Liaud, H. Vilter e D. Schomburg, *Journal of Molecular Biology* **293** (1999) 595-611.
24. J. M. Arber, E. de Boer, C. D. Garner, S. S. Hasnain e R. Wever, *Biochemistry* **28** (1989) 7968-7973.
25. L. H. Simons, P. Barnett, E. G. M. Vollenbroek, H. L. Dekker, A. O. Muijers, A. Messerschmidt e R. Wever, *European Journal of Biochemistry* **229** (1995) 566-574.
26. A. Messerschmidt e R. Wever, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93** (1996) 392-396.
27. M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murshudov e J. A. Littlechild, *Journal of Molecular Biology* **299** (2000) 1035-1049.
28. S. Macedo-Ribeiro, W. Hemrika, R. Renirie, R. Wever e A. Messerschmidt, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **4** (1999) 209-219.
29. W. Hemrika, R. Renirie, H. L. Dekker, P. Barnett e R. Wever, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94** (1997) 2145-2149.
30. K. Ishikawa, Y. Mihara, K. Gondoh, E. Suzuki e Y. Asano, *EMBO Journal* **19** (2000) 2412-2423.
31. N. Tanaka, V. Dumay, Q. Liao, A. J. Lange e R. Wever, *European Journal of Biochemistry* **269** (2002) 2162-2167.
32. H. B. Ten Brink, A. Tuynman, H. L. Dekker, W. Hemrika, Y. Izumi, T. Oshiro, H. E. Schoemaker e R. Wever, *Inorganic Chemistry* **37** (1998) 6780-6784.
33. F. Van de Velde, L. Konemann, F. Van Rantwijk e R. A. Sheldon, *Biotechnology and Bioengineering* **67** (2000) 87-96.
34. S. L. Neidleman e J. Geigert, *Biohalogenation: Principles, Basic Rules and Applications*, Ellis Horwood Limited, John Wiley & Sons, New York, 1986.
35. R. R. Everett, H. S. Soedjak e A. Butler, *Journal of Biological Chemistry* **265** (1990) 15671-15679.
36. H. S. Soedjak, J. V. Walker e A. Butler, *Biochimica and Biophysica Acta* **1079** (1991) 1-7.
37. M. C. R. Franssen, *Biocatalysis* **10** (1994) 87-111.
38. A. Butler e J. N. Carter-Franklin, *Natural Product Reports* **21** (2004) 180-188.
39. W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt e R. Wever, *Journal of Biological Chemistry* **274** (1999) 23820-23827.
40. R. Renirie, W. Hemrika e R. Wever, *Journal of Biological Chemistry* **275** (2000) 11650-11657.
41. M. Weyand, H. -J. Hecht, M. Kieß, M. F. Liaud, H. Vilter e D. Schoumbourg, *Journal of Molecular Biology* **293** (1999) 595-611.
42. H. Dau, J. Dittmer, M. Epple, J. Hanss, E. Kiss, D. Redher, C. Schulzke e H. Vilter, *FEBS Letters* **457** (1999) 237-240.
43. M. Andersson, A. Willetts, S. Allenmark, *Journal of Organic Chemistry* **62** (1997) 8455-8458.
44. M. P. J. van Deurzen, F. van Rantwijk e R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **53** (1997) 13183-13220.
45. V. M. Dembitsky, *Tetrahedron* **59** (2003) 4701-4720.
46. S. Hu e J. S. Dordick, *Journal of Organic Chemistry* **67** (2002) 314-317.
47. A. G. J. Ligtenbarg, R. Hage e B. L. Feringa, *Coordination Chemistry Reviews* **237** (2003) 89-101.
48. L. Dai e A. M. Klibanov, *Biotechnology and Bioengineering* **70** (2000) 353-357.
49. E. Baciochi, M. F. Gerini, P. J. Harvey, O. Lanzalunga e S. Mancinella, *European Journal of Biochemistry* **267** (2000) 2705-2710.
50. K. Nakajima, M. Kojima, K. Toriumi, K. Saito e J. Fujita, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **62** (1989) 760-776.
51. M. Picard, J. Gross, E. Lübbert, S. Tölzer, S. Krauss, K.-H. van Pée e A. Berkessel, *Angewandte Chemie* **109** (1997) 1245-1248.
52. A. H. Vetter e A. Berkessel, *Tetrahedron Letters* **39** (1998) 1741-1744.
53. A. K. Sharipov, *Russian Journal of Applied Chemistry* **76** (2003) 108-113.
54. S. Kobayashi, M. Nakano, T. Kimura, e P. A. Schaap, *Biochemistry* **30** (1987) 5019-5022.
55. S. G. Allenmark e M. A. Andersson, *Chirality* **10** (1998) 246-252.
56. H. B. Ten Brink, H. E. Schoemaker e R. Wever, *European Journal of Biochemistry* **268** (2001) 132-138.
57. F. Di Furia e G. Modena, *Pure & Applied Chemistry* **54** (1982) 1853-1866.
58. H. B. Ten Brink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker e R. Wever, *Journal of Inorganic Chemistry* **30** (2000) 91-98.
59. A. Tuynman, M. K. S. Vink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker e R. Wever, *European Journal of Biochemistry* **258** (1998) 906-913.

Mystery SOLVED

Gemini™ with new Twin™
(Two-In-One) Technology
provides pH 1-12 stability with
no sacrifice in performance.
Gemini is engineered to provide
unmatched performance
and column lifetime.

Gemini™

Gemini™ C18 vs. Waters® XTerra® MS C18*

Columns: Gemini™ 5µ C18
Waters® XTerra® 5µ MS C18

Dimensions: 150 x 4.6mm

Mobile Phase: Acetonitrile/50mM Methylpyrrolidine Buffer, pH 11.5 (50:50)

Flow Rate: 1 mL/min

Temperature: Ambient

Detection: UV @ 254nm

Sample Analyte: Diphenhydramine

Visit

www.phenomenex.com/gemini

www.phenomenex.com

Phenomenex products are available worldwide. For the distributor in your country, contact Phenomenex USA, International Department by telephone, fax or e-mail: international@phenomenex.com.

USA

tel.: (310) 212-0555

email: info@phenomenex.com

Puerto Rico

(800) 541-HPLC

info@phenomenex.com

Canada

(800) 543-3681

info@phenomenex.com

United Kingdom

01625-501367

ukinfo@phenomenex.com

Germany

06021-58830-0

anfrage@phenomenex.com

New Zealand

09-4780951

info@phenomenex.co.nz

Australia

02-9428-6444

info@phenomenex.com.au

phenomenex®
...breaking with tradition™

*XTerra® is a registered trademark of Waters, Inc. Gemini™ is a trademark of Phenomenex. Phenomenex is in no way affiliated with Waters.

© 2004 Phenomenex Inc.