

## HEMOGLOBINA EXTRACELULAR GIGANTE DE *Glossoscolex paulistus*: UM EXTRAORDINÁRIO SISTEMA SUPRAMOLECULAR HEMOPROTEICO

Leonardo Marmo Moreira\*, Pedro Claudio Guarano de Moraes e José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça

Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rei, Praça Frei Orlando, 170, 36307-532 São João Del Rei – MG, Brasil

Luciana Guimarães e Juliana Pereira Lyon

Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de São João Del Rei, Praça Frei Orlando, 170, 36307-532 São João Del Rei – MG, Brasil

Flávio Aimbire

Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos - SP, Brasil

Alessandra Lima Poli e Hidetake Imasato

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 26/1/10; aceito em 1/6/10; publicado na web em 22/9/10

GIANT EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN OF *Glossoscolex paulistus*: AN EXTRAORDINARY SUPRAMOLECULAR HEMOPROTEIN SYSTEM. Giant extracellular hemoglobins are considered the summit of complexity in systems that carry oxygen, constituting an extraordinary model system to the study of hemoproteins. This class includes the hemoglobin of the annelid *Glossoscolex paulistus* that presents high cooperativity, great oligomeric and redox stabilities and ability of oligomeric reassociation. These properties have motivated evaluations about its utilization as prototype of artificial blood and biosensor. Kinetic studies involving autoxidation and detailed spectroscopic characterizations of its ferrous and ferric species have propitiated information about the structure-activity relationship of this macromolecule. The present review analyzes several biochemical issues, evaluating the state-of-art of this subject.

Keywords: hemoglobin; ligand exchange; autoxidation.

### INTRODUÇÃO

A hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) é uma hemoproteína que constitui um sistema carregador de oxigênio *in vivo* e, conseqüentemente, credenciado pela seleção natural, apresentando características extremamente interessantes em termos de evolução como, por exemplo, sua possível adaptação a meios ricos em sulfetos.<sup>1</sup> Esta hemoproteína apresenta uma extraordinária massa molecular, em torno de 3,1 MDa,<sup>2</sup> com uma unidade estrutural básica altamente organizada, contendo 144 cadeias que apresentam o grupo heme, além da presença de aproximadamente 36 cadeias que não apresentam este grupamento prostético.

Os sistemas hemoglobínicos gigantes extracelulares, também conhecidos por eritrocruorinas,<sup>3</sup> constituem arranjos supramoleculares proteicos tão elaborados do ponto de vista da sua relação estrutura/atividade, que são considerados, segundo Vinogradov,<sup>4,5</sup> o ápice de complexidade em se tratando de hemoproteínas que ligam oxigênio.

Além disso, este grupo de hemoglobinas é conhecido por ligações de oxigênio altamente cooperativas.<sup>6-8</sup> Entre elas, destaca-se a hemoglobina de *Lumbricus terrestris*, que vem sendo amplamente estudada por diversos grupos e que apresenta similaridade macromolecular com a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*. Cálculos por homologia envolvendo o monômero *d* de *Glossoscolex paulistus* constataram uma identidade estrutural de 54% em relação ao monômero *d* de *Lumbricus terrestris*.

A título de ilustração, é interessante mencionar que a hemoglobina de *Lumbricus terrestris* vem sendo aplicada em pesquisas sobre sangue artificial,<sup>7,9,10</sup> devido à sua natureza extracelular, grande tamanho e resistência à oxidação. Em relação a este último tópico, vale citar

os trabalhos de Dorman e colaboradores<sup>9</sup> e Madura e colaboradores<sup>8</sup> que, por meio de estudos espectroeletróquímicos, têm determinado que a hemoglobina de *Lumbricus terrestris* exibe potenciais redox altamente positivos (de +112 até +61 mV) quando comparados aos potenciais negativos das hemoglobinas tetraméricas e mioglobinas (de -150 até -48 mV).

Hirsch e colaboradores<sup>10</sup> asseveram que, em pH neutro, a hemoglobina de *Lumbricus terrestris*, na forma ferrosa, exibe afinidade por oxigênio e cooperatividade similares àquelas apresentadas pela hemoglobina humana. Além disso, Dorman e colaboradores<sup>9</sup> acentuam que o uso de hemoglobina humana, que é removida das hemácias, se mostra pouco efetivo para atuar como substituto para o sangue já que, sendo uma hemoglobina tetramérica, em soluções diluídas dissocia em dímeros, apresentando menor cooperatividade em relação ao oxigênio.

Além de não apresentar esta dissociação, as hemoglobinas gigantes extracelulares são mais fáceis de serem estocadas, apresentam custos menores e são menos suscetíveis de causar respostas imunogênicas em função de não estarem associadas às células e, portanto, não estarem relacionadas à presença contígua de membranas plasmáticas, que são fatores desencadeadores de respostas imunológicas. Também é importante mencionar que a hemoglobina extracelular gigante é uma hemoglobina natural, sendo particularmente utilizável por meio de técnicas de DNA recombinante.<sup>9</sup>

As hemoglobinas são relevantes para a compreensão tanto da regulação alostérica das proteínas como da cooperatividade das mesmas e, apesar do grande número de publicações na área, ainda apresentam uma série de questões não respondidas.<sup>11</sup> Um foco de grande interesse, por exemplo, diz respeito aos mecanismos de formação e às implicações do surgimento das espécies chamadas hemicromo, ou seja, as espécies bis-histidínicas, cuja formação em algumas hemoproteínas

\*e-mail: leonardomarmo@gmail.com

estudadas mais recentemente, como a citoglobina e a neuroglobina, apresentaria, inclusive, funções biológicas.<sup>12</sup> Além disso, os hemocromos apresentariam potenciais redox baixos<sup>13,14</sup> e em hemoglobinas tetraméricas sua formação estaria associada ao surgimento de corpos de Heinz e ao envelhecimento celular das hemácias.<sup>15</sup>

Dentro deste contexto, a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* apresenta, além de características não usuais de estabilidade frente a processos de desnaturação e oxidação, características cooperativas<sup>16</sup> que a tornam um interessante sistema modelo de hemoglobinas e sistemas hemoproteicos em geral. Estas propriedades têm motivado trabalhos com diferentes abordagens como, por exemplo, estudos químico-imunológicos da interação desta proteína com anticorpos.<sup>17</sup>

A presente revisão visa, portanto, estudar as propriedades estruturais da hemoglobina em questão, com especial enfoque para o sistema férrico-porfirínico e as possíveis correlações entre as mudanças conformacionais da globina e as alterações sofridas pela primeira esfera de coordenação do centro férrico em função do pH. Viola e colaboradores<sup>18</sup> sugerem que, em estudos envolvendo citocromo *c*, existe uma interdependência entre propriedades redox, características estruturais, constante de ligação de ligantes e propriedades de reconhecimento. É provável que esse interrelacionamento das propriedades fundamentais à função da proteína, em maior ou menor grau, também ocorra para as hemoglobinas.

## A QUÍMICA BIOINORGÂNICA DO FERRO

O ferro é o mais abundante elemento de transição na crosta terrestre e, em geral, em todas as formas de vida.<sup>19</sup>

Em mamíferos, é significativo o número e a relevância das biomoléculas que utilizam íons metálicos, sendo que as proteínas constituem grande parte deste total. Em torno de 30% das enzimas dos mamíferos apresentam um íon metálico nos respectivos sítios ativos, o que ressalta a importância da área interdisciplinar conhecida como química bioinorgânica.<sup>20-22</sup>

Assim sendo, o ferro é considerado o metal de transição mais difundido entre os vários metais atuantes no meio biológico, com cerca de 70% do ferro ativo nos mamíferos encontrando-se na forma de complexos porfirínicos em hemoproteínas, entre as quais, citocromos, hemoglobina e mioglobina.<sup>23</sup> Além dessa presença marcante nos seres eucariontes, várias espécies de hemoglobina têm sido descobertas em seres procariontes na última década.<sup>24</sup>

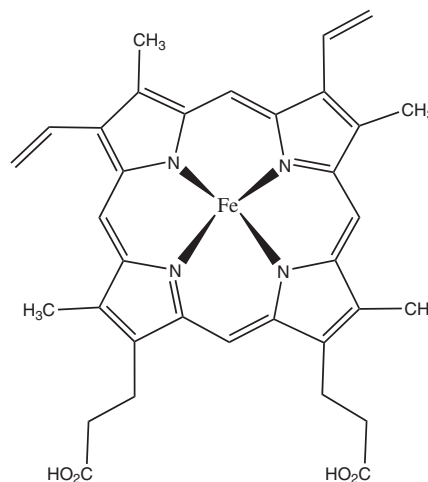
### Porfirinas

A porfirina é um macrociclo contendo quatro anéis pirrólicos ligados por átomos de carbono. O termo porfirina é oriundo do grego *porphura*, utilizado para descrever a cor púrpura, sendo derivado de uma antiga palavra semítica, usada pelos fenícios para descrever os moluscos dos quais era extraído um pigmento chamado *púrpura tiria*, que não se trata de uma porfirina, no sentido atribuído a essa palavra atualmente. Nesta época, o pigmento *púrpura tiria* era utilizado para a confecção de vestuário. Posteriormente, a palavra passou a ser empregada para várias pedras e minerais de coloração vermelha intensa, indicando uma das atuais aplicações das porfirinas que consiste na ação corante,<sup>25</sup> a qual é justificada pela significativa absorvidade molar deste macrociclo.

A estrutura básica das porfirinas é a porfina. Os derivados da porfina são chamados de porfirinas e os derivados metálicos são as metaloporfirinas.<sup>23</sup>

A porfirina apresenta quatro nitrogênios, cada um contendo um par de elétrons não ligantes no centro do anel, o que torna esse tetrazamacrociclo muito hábil na formação de ligações coordenadas com cátions metálicos como, por exemplo, os íons do elemento ferro (Figura 1). Portanto, essa ligação ocorre em função da possibilidade

de se formarem ligações covalentes, conhecidas como dativas ou coordenadas, entre os nitrogênios porfirínicos e o centro catiônico. A porfirina pode existir na forma de base livre ou na forma metálica. A forma de base livre é estabilizada através da presença de dois hidrogênios justapostos a dois nitrogênios. Se os prótons se ligam a dois nitrogênios vizinhos a simetria é  $C_{2v}$ , se a ligação se dá em nitrogênios alternados a simetria é  $D_{2h}$ . Com a presença do metal, em se tratando de sistemas hexacoordenados, a simetria é aumentada para  $D_{4h}$  para o caso dos ligantes axiais serem os mesmos, ou  $C_{4v}$  quando os ligantes axiais forem diferentes.



**Figura 1.** Complexo ferro-protoporfirina IX com destaque para o íon de ferro como centro de coordenação e os nitrogênios porfirínicos como sítios coordenantes

As insaturações do anel porfirínico respondem por grande parte dessa estabilidade, que também está relacionada com o ganho entrópico intrínseco a um ligante tetradentado. Complexos macrocíclicos exibem acentuada estabilidade cinética e termodinâmica que constituem uma manifestação do que se convencionou chamar de “efeito macrocíclico”.<sup>26</sup> Tais insaturações, além de afetarem a rigidez do sistema, acentuam a deslocalização eletrônica através de uma interação  $\pi$  bastante intensa. Vários estudos de ressonância paramagnética eletrônica têm confirmado uma substancial transferência de densidade eletrônica entre o centro metálico e macrociclo.<sup>26</sup>

Os sistemas conjugados proporcionam consequências eletrônicas e estéricas estabilizantes da ligação metal-anel porfirínico, devidas tanto ao potencial estabelecimento de ligações  $\pi$  entre o anel e o íon metálico central, como à perda relativa de flexibilidade associada às restrições do número de modos possíveis de coordenação. Este fenômeno não ocorre com macrociclos saturados como, por exemplo, o cyclam, que apresenta as configurações de barco e de cadeira, em função, justamente, da maior flexibilidade do anel.

O efeito macrocíclico acentuado que ocorre em sistemas insaturados pode repercutir, inclusive, em uma estabilização de estados de oxidação não usuais como, por exemplo, ferro(V)<sup>27</sup> e ferro(IV).<sup>28-30</sup> Esta estabilidade juntamente com a conhecida versatilidade dos sistemas macrocíclicos têm motivado várias pesquisas envolvendo complexos macrocíclicos modelos e macrociclos bases livres, além das próprias hemoproteínas, em um número amplo de estudos interdisciplinares como, por exemplo, transporte de oxigênio,<sup>31,32</sup> agregação e dimerização,<sup>33</sup> dimerização e equilíbrio,<sup>34</sup> terapia fotodinâmica,<sup>35,36</sup> interação com sistemas modelos de membranas biológicas,<sup>37-40</sup> cálculos quânticos de espectros e estruturas eletrônicas de hemoproteínas,<sup>41</sup> sensores eletroquímicos,<sup>42-45</sup> modificação de superfícies por meio de filmes finos,<sup>46-49</sup> confecção de sistemas supramoleculares,<sup>50-52</sup> reconstituição

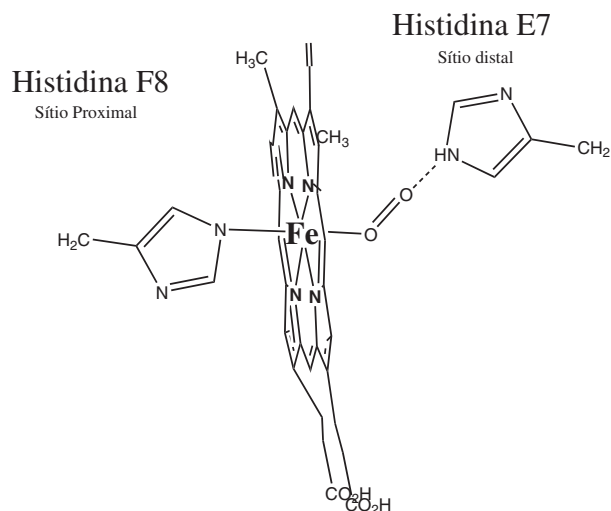
de hemoproteínas,<sup>53-58</sup> transferência de elétrons em hemoproteínas,<sup>59</sup> mimetismo de hemoproteínas por meio de metaloporfirinas contendo ligantes axiais ligados ao anel porfirínico,<sup>60</sup> cooperatividade de hemoproteínas,<sup>61-63</sup> auto-oxidação de hemoproteínas<sup>16,64-66</sup> e de complexos modelos,<sup>67</sup> desnaturação de hemoproteínas,<sup>68</sup> fotodissociação em hemoproteínas,<sup>69</sup> estudos fotoquímicos com hemoproteínas,<sup>70</sup> interação com moléculas de importância biológica,<sup>71</sup> estabilidade do heme em hemoglobinas,<sup>72</sup> estudos cristalográficos de hemoglobinas,<sup>73-76</sup> mimetismo de enovelamento proteico e catálise via imobilização de metaloporfirinas em zeólitas,<sup>77,78</sup> em óxidos metálicos<sup>79,80</sup> e em silicatos,<sup>81</sup> biomimetismo de hemoproteínas por meio de complexos modelos,<sup>82</sup> entre outros.

O estudo das hemoproteínas e o uso de sistemas modelos visando a contribuição no entendimento destes biopolímeros constituem uma das áreas mais representativas da química bioinorgânica. A ampla aplicação de sistemas modelos para o estudo de hemoproteínas poderia ser atribuída, em parte, às dificuldades encontradas na análise do espectro de absorção na região do ultravioleta-visível dessas hemoproteínas, principalmente no que se refere às bandas que possuem contribuição direta do centro metálico, que são, em muitos casos, superpostas pelas bandas intrínsecas do anel porfirínico, isto é, as bandas intraligantes da porfina.<sup>23</sup> Um outro motivo consiste na significativa dificuldade em empreender-se estudos eletroquímicos de hemoproteínas. Essa dificuldade está relacionada a algumas propriedades inerentes ao sistema hemoproteico como, por exemplo, ao fato do grupamento prostético se encontrar isolado no bolsão hidrofóbico do heme, resultando em grande distância entre o sítio redox e a superfície do eletrodo; à requisição de alta energia de ativação para mudanças conformacionais associadas às transições redox; à limitação do processo redox pela dissociação e associação do ligante água às formas oxidada e reduzida do centro metálico; às impurezas macromoleculares e proteínas desnaturadas que adsorvem no eletrodo bloqueando a transferência de elétrons entre heme e eletrodo e, às possíveis orientações desfavoráveis das hemoproteínas sobre a superfície do eletrodo, inviabilizando a transferência de elétrons.<sup>83</sup> De qualquer maneira, os estudos com hemoproteínas e com complexos metálicos modelos são complementares e igualmente importantes, uma vez que determinadas características das hemoproteínas nem sempre conseguem ser mimetizadas pelos sistemas modelos adequadamente como, por exemplo, a orientação fixa dos ligantes axiais.<sup>60,84</sup>

Vale lembrar que a química dos ligantes macrocíclicos recebeu especial destaque com o prêmio Nobel de 1987 outorgado a Lehn, Pedersen e Cram,<sup>23,26,85</sup> o que ilustra as implicações e relevâncias discutidas acima.

Um aspecto interessante diz respeito aos fenômenos que ocorrem no sítio distal (Figura 2). Um exemplo ilustrativo destes fenômenos enfocando o centro ferroso vem sendo constatado. O ligante O<sub>2</sub>, em condições que se aproximam daquelas apresentadas pelo meio fisiológico, apresentaria acidez  $\pi$  superior ao ligante CO, apesar dos dois elétrons presentes no nível orbital duplamente degenerado  $\pi^*$ , os quais não ocorrem no ligante CO.<sup>86,87</sup> Estudos que buscam explicar comportamentos como este têm mostrado que a ligação Fe-CO não se dispõe perpendicularmente, devido à pequena distância entre o centro ferroso e histidina distal, e que a ligação de hidrogênio proveniente da histidina distal liga o O<sub>2</sub> mas não liga o CO.<sup>88,89</sup> De qualquer maneira, a compreensão total do papel do imidazol das histidinas proximal e distal no controle das propriedades de hemoproteínas ainda é algo desafiador.<sup>90-93</sup> De fato, se não fosse a presença dos resíduos do bolsão hidrofóbico, que minimizam a diferença de afinidade entre CO e O<sub>2</sub> em relação ao centro ferroso, a função das hemoproteínas e, por consequência, a vida conforme a concebemos, seria impossível, pois a quebra catabólica dos hemes e a atividade de neurotransmissores produzem CO suficiente para, em tal circunstância, inibir a coordenação de O<sub>2</sub> ao centro metálico.<sup>89</sup> Tal fenômeno ocorre em função,

principalmente, das restrições estéricas criadas pela proximidade da histidina distal, que inviabiliza a disposição linear do ligante CO coordenado de forma perpendicular ao plano porfirínico. Por outro lado, essa restrição não afeta a intensidade da ligação de O<sub>2</sub>. Este fato, juntamente com a ligação de hidrogênio extremamente efetiva que ocorre entre O<sub>2</sub> e a histidina distal, acaba por favorecer significativamente esta ligação com o centro ferroso,<sup>89</sup> tornando possível o transporte de oxigênio nos seres vivos.



**Figura 2.** Representação dos sítios de coordenação axiais proximal (Hélice F8) e distal (Hélice E7) do heme, com destaque para a posição distal onde se coordena o oxigênio molecular

Por outro lado, a dissociação do sexto ligante, que em meio biológico seria o caso do oxigênio ligado às hemoglobinas, também é um fenômeno fundamental para a função das hemoglobinas, o que leva à formação de uma espécie pentacoordenada. Tal dissociação proporciona ao íon ferroso uma transição em sua configuração eletrônica, que passa de uma distribuição eletrônica baixo spin para uma configuração alto spin.

Atribui-se ao sutil aumento do volume iônico, em decorrência da mudança de baixo para alto spin, a saída do ferro do plano porfirínico em aproximadamente 0,4 Å. Isto ocorre devido a uma certa tensão do anel porfirínico, que implica em uma maior repulsão interatômica, ocasionando a saída do íon metálico do centro do macrociclo. Porém, esta estabilidade mecânica do anel porfirínico é relativa, sendo a flexibilidade deste ligante macrociclo responsável por muitas de suas propriedades.<sup>94</sup> Além disso, o movimento de saída do íon metálico do centro do anel também está relacionado ao fenômeno da cooperatividade das hemoglobinas, através da influência mútua das cadeias polipeptídicas que se organizam em uma conformação espacial conhecida como estrutura quaternária, como é o caso da hemoglobina humana, por exemplo. De fato, a cooperatividade é fator decisório em relação à afinidade das sub-unidades pelo oxigênio, sendo, por conseguinte, aspecto importante da relação estrutura/atividade das hemoglobinas.<sup>95</sup>

Um dado que ilustra a afinidade dos sistemas macrocíclicos pelos íons metálicos vem sendo constatado através de tentativas frustradas de síntese orgânica de vários macrociclos na ausência do íon metálico, ou seja, sem o chamado efeito *template* (efeito fôrma ou molde) de coordenação. Apesar desse fato não se aplicar à porfina, esse fenômeno é comum a vários macrociclos. Este efeito *template* consiste no direcionamento por parte do íon metálico do processo de fechamento do anel, evitando diversos caminhos reacionais que são possíveis na ausência do cátion e que diminuem significativamente os rendimentos das reações de síntese de um macrociclo específico.

Essas dificuldades de síntese dos macrociclos na ausência de uma indução catiônica realçam o fato de que várias reações de condensação de macrociclos são inviáveis na ausência do metal e que, também por isso, os tornam extremamente difíceis de serem deslocados do centro catiônico previamente coordenado.<sup>20,23,26</sup>

### A INFLUÊNCIA DO ENOVELAMENTO GLOBÍNICO DOS GRUPAMENTOS HEMES SOBRE AS PROPRIEDADES DAS FERRO-PORFIRINAS EM HEMOPROTEÍNAS

Quanto à relação entre globina e heme, o microambiente que a cadeia polipeptídica constrói ao redor do bolsão do anel porfirínico é de grande importância. Nesses sistemas, a estrutura globular da proteína apresenta, basicamente, três funções: solubilizar os grupamentos heme, que são, normalmente, insolúveis em meio aquoso; proporcionar às circunvizinhanças da ferro-porfirina um microambiente hidrofóbico, extremamente útil para que o contato entre o íon ferroso e a água do sangue seja o mínimo possível, por conseguinte, preservando o menor estado de oxidação do metal; isolar os grupamentos heme uns dos outros, impedindo a dimerização das ferro-porfirinas.<sup>23</sup>

É relevante mencionar que um dos fatores fundamentais para que o enovelamento hidrofóbico do bolsão do heme consiga cumprir as funções supracitadas consiste na deslocalização da carga do centro metálico em todo o anel porfirínico. Segundo estudos recentes,<sup>96</sup> essa distribuição da densidade de carga do centro de coordenação por todo o macrociclo, partindo-se dos nitrogênios coordenados ao ferro, é um requisito para acomodar o heme em um ambiente de baixa constante dielétrica.<sup>96</sup> Essa informação deve ser ressaltada em um estudo onde a modificação das condições do meio pode alterar a acessibilidade do solvente ao heme, alterando várias propriedades do sistema porfirínico.

### Hemoglobinas

A hemoglobina humana foi a primeira proteína cujas estruturas terciária e quaternária foram determinadas. Esta caracterização foi feita por Max Perutz e colaboradores da Universidade de Cambridge, em 1959, através de um emprego pioneiro de raios X na caracterização de proteínas.<sup>97</sup>

Trata-se de uma hemoproteína intracelular, isto é, se localiza nas hemácias e possui um arranjo tetraédrico, sendo constituída de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  unidas por interações fracas, não covalentes, como pontes salinas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals.

A hemoglobina tem por função transportar oxigênio do pulmão para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão. Nos tecidos ocorre a liberação do oxigênio, devido às baixas pressões de  $O_2$  ( $pO_2 \approx 20$  torrs), que diminuem a afinidade da hemoglobina pelo gás, em função do deslocamento do equilíbrio químico. Nos pulmões, as altas pressões de  $O_2$  ( $pO_2 \approx 100$  torrs) saturam a hemoglobina rapidamente. O dióxido de carbono, por sua vez, é transportado pela desoxihemoglobina de dois modos:

Pela ligação direta do  $CO_2$  ao terminal amínico (1)



e como íon bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) em solução, a partir da hidratação do  $CO_2$  do plasma (2)



Ao atingir o pulmão, a desoxi-hemoglobina libera os prótons, deslocando o equilíbrio para a liberação do  $CO_2$ , que é eliminado na expiração.<sup>97</sup>

A liberação dos gases transportados é também controlada pelo pH, que consiste em um fenômeno conhecido como efeito Bohr. A ligação do oxigênio na hemoglobina é cooperativa, ou seja, a coordenação do  $O_2$  a um heme facilita a coordenação de outra molécula de  $O_2$  com outro heme do mesmo tetrâmero. A recíproca é verdadeira, ou seja, a saída desta molécula de  $O_2$  de um determinado grupo heme facilita a saída das moléculas de  $O_2$  dos outros hemes.<sup>97</sup>

O armazenamento do oxigênio é realizado pela mioglobina que está distribuída nos músculos. A mioglobina é um monômero, isto é, constitui-se de uma única sub-unidade, não apresentando o fenômeno da cooperatividade.

O heme (Figura 1) é um grupo prostético que se encontra no interior do enovelamento de cada cadeia polipeptídica da hemoglobina. Sua estrutura consiste de quatro anéis pirrólicos coplanares, ligados entre si através de uma ponte de metina. A cada um dos anéis C e D está ligado um grupo propionato, uma metila em cada anel, e em cada um dos anéis A e B está ligado um grupo eteno. Os átomos de nitrogênios dos anéis pirrólicos estão orientados para o centro da estrutura, sendo responsáveis pela quelação de um íon de ferro central. Esse íon se encontra na forma ferrosa e é coordenado pelo oxigênio para o transporte deste ligante fundamental à vida.

A vizinhança do grupo heme é constituída de resíduos apolares com exceção de duas histidinas, a distal (E7, sétimo resíduo da hélice E) e a proximal (F8, oitavo resíduo da hélice F) (Figura 2).

Desta forma, tanto a hemoglobina como a mioglobina desempenham suas respectivas funções fisiológicas com o centro metálico no estado ferroso, isto é, no estado de oxidação +2. Há seis sítios de coordenação ao redor do íon ferroso, em função do centro de coordenação Fe(II) apresentar uma configuração eletrônica  $d^6$ . Destes seis sítios de coordenação, quatro sítios estão coordenados a átomos de nitrogênio pirrólicos do anel porfirínico.

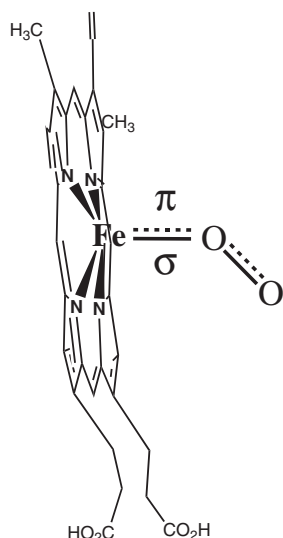
A porfirina é um ligante macrocíclico tetradentado, pois coordena o metal através de quatro sítios de ligação. O fato de ser tetradentado está relacionado com representativa estabilidade termodinâmica dos compostos de coordenação porfirínicos, tanto do ponto de vista entrópico como do ponto de vista entálpico. Esta estabilidade peculiar a ligantes volumosos vem sendo chamada de “efeito macrocíclico” e é bastante comum aos ligantes tetra-azamacrocíclicos.<sup>98</sup>

A quinta posição de coordenação do heme é ocupada pelo átomo de nitrogênio de um imidazol, oriundo do grupo lateral da histidina proximal, sobre o qual o heme se apóia na proteína. Portanto, o imidazol da histidina proximal é o ligante endógeno responsável pela ligação entre o grupamento prostético e a cadeia polipeptídica. O sexto sítio de coordenação está disponível para ligar-se a um ligante exógeno, podendo alterar o estado de spin do centro de coordenação, e até mesmo favorecer a modificação do estado de oxidação do metal.

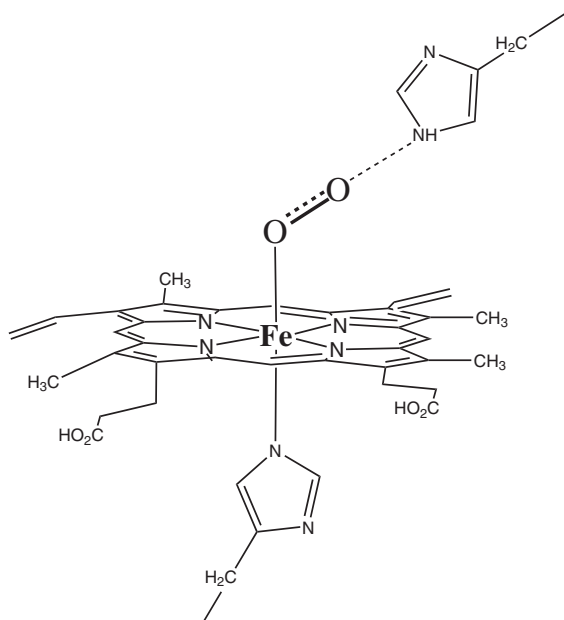
O íon ferroso, que se encontra fora do plano do heme na desoxi-hemoglobina, move-se durante o processo de oxigenação em direção ao plano da porfirina para formar uma ligação forte com o oxigênio (Figura 3), restabelecendo a planaridade do heme (Figura 4). Este fenômeno, que é fundamental para a cooperatividade das hemoglobinas, está relacionado a várias propriedades do heme.

Realmente, é bem conhecido na literatura que as várias mudanças conformacionais possíveis do anel porfirínico e suas consequentes alterações na combinação de orbitais moleculares são responsáveis por propriedades redox e alterações em afinidades por ligantes em complexos ferro-porfirínicos modelos e hemoproteínas.<sup>98</sup>

Medidas de infravermelho e espectroscopia Mössbauer indicam claramente que a conversão tanto da mioglobina como da hemoglobina para suas formas oxigenadas está associada a um rearranjo eletrônico. Isto pode ser descrito por uma representativa doação  $\pi$  (transferência de carga) do Fe(II) para o  $O_2$  e uma doação  $\sigma$  (coor-



**Figura 3.** Representação esquemática da inclinação da molécula de oxigênio atuando como sexto ligante da primeira esfera de coordenação do centro ferroso do heme



**Figura 4.** Representação da histidina E7, distal, proporcionando estabilidade à ligação Fe-O<sub>2</sub> através da formação de uma ligação de hidrogênio entre o NH do imidazol e o oxigênio molecular

denação) do O<sub>2</sub> para o Fe(II), resultando na forte ligação covalente entre o ferro e o oxigênio.<sup>65</sup>

No caso fisiológico, a histidina E7, denominada distal, está voltada à sexta coordenação do ferro, estabilizando a ligação Fe-O<sub>2</sub> (Figura 4) pela formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo NH do imidazol e o oxigênio molecular.

O próton proveniente da histidina distal, efetivando uma ligação de hidrogênio com o oxigênio molecular coordenado ao centro ferroso, deve gerar um efeito indutivo sobre o ligante oxigênio, acentuando as propriedades eletrofílicas deste ligante. Esta influência torna o oxigênio mais apto para “retirar” densidade eletrônica do centro de coordenação do heme.

É conhecido na literatura que a ligação de hidrogênio entre a histidina distal e o oxigênio molecular coordenado como sexto ligante

do centro ferroso seria um fator decisivo para a ligação de oxigênio nas hemoproteínas. Isto ocorre porque a ligação de hidrogênio em questão estabilizaria significativamente os orbitais π\* do oxigênio molecular, acentuando seu caráter ácido π e a consequente retrodoação dos orbitais de simetria π do ferro, *d<sub>xz</sub>* e *d<sub>yz</sub>*, para estes orbitais semi-preenchidos do oxigênio. Portanto, a estabilização dos orbitais π\* torna o oxigênio um ligante viável para as hemoglobinas, ou seja, um ligante com afinidade pelo centro ferroso suficiente para competir por essa coordenação.

### O anelídeo *Glossoscolex paulistus*

O anelídeo *Glossoscolex paulistus* pertence ao filo Anelidae, à classe Oligochaeta e à família Glossoscolecidae.<sup>99,100</sup> Este invertebrado apresenta um comprimento que varia de 280 a 305 mm e o maior diâmetro, na região mediana do corpo, alcança de 10 a 11 mm.<sup>101</sup>

Este anelídeo de tamanho expressivo, conhecido popularmente como “minhocogu”, é encontrado em determinados sítios das cidades de Piracicaba, Araras e Rio Claro, no estado de São Paulo, Brasil.<sup>101</sup> Tais localidades apresentam solos superficiais calcários que favorecem o desenvolvimento deste anelídeo.<sup>99,102</sup> É possível que exista uma relação entre essa preferência, ratificada pela seleção natural e a reconhecida relevância dos íons cálcio na organização das 180 sub-unidades polipeptídicas do arranjo espacial da hemoglobina. De qualquer maneira, animais da mesma classe da espécie *Glossoscolex paulistus* como, por exemplo, a espécie *Lumbricus terrestris*, vem sendo empregados em vários estudos ecológicos de solos em função de suas ações de reciclagem de nutrientes e de dinâmica de solos,<sup>103,104</sup> visando a fertilidade do solo.

### A hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*

Existem três classes de anelídeos: Polichaeta, Oligochaeta e Hirudina,<sup>105</sup> sendo que as hemoglobinas apresentam variações quanto à localização, podendo ser intracelulares como, por exemplo, em *Glycera dibranchiata*; extracelulares como, por exemplo, em *Lumbricus terrestris* e *Glossoscolex paulistus*; e intracelulares e extracelulares simultaneamente como, por exemplo, em *Ampherite ornata*.<sup>99,100</sup> Entre os quatro tipos de “proteínas respiratórias” existentes, que são as hemocianinas, hemoeritrinas, clorocruorinas e hemoglobinas, estas últimas representam uma classe amplamente distribuída tanto nos animais vertebrados como nos invertebrados.<sup>106</sup>

A longa história da pesquisa sobre hemoglobinas gigantes teve início com a primeira descoberta, em 1933, por Svedberg<sup>107</sup> de uma proteína vermelha de tamanho enorme (180 sub-unidades polipeptídicas) encontrada no sangue de uma minhoca, ou seja, um invertebrado. Estudos subsequentes demonstraram uma estrutura hierárquica característica para o arranjo quaternário dessas hemoglobinas.<sup>107</sup>

As hemoglobinas extracelulares de bicamada hexagonal se apresentam aproximadamente como dois hexágonos superpostos. Estas hemoglobinas são biopolímeros gigantes encontrados na maioria dos anelídeos terrestres, aquáticos, marinhos e em anelídeos de mar profundo.<sup>4,108,109</sup> Além disso, possuem alta cooperatividade na ligação com o oxigênio molecular<sup>8,110</sup> e apresentam um ponto isoelétrico abaixo de 7, com as cadeias *linkers* (cadeias sem grupamento prostético com função estrutural) possuindo um ponto isoelétrico entre pH 4,7 e 5,6,<sup>5</sup> além de constituírem sistemas significativamente auto-organizáveis, como demonstram estudos envolvendo reassociação das cadeias.<sup>5,111</sup> Segundo Vinogradov,<sup>4</sup> as hemoglobinas extracelulares gigantes representam o ápice de complexidade das hemoproteínas que ligam oxigênio. Tais hemoglobinas são sistemas supramoleculares interessantes sob o aspecto da seleção natural, uma vez que, aparentemente, demonstram propriedades de adaptação não triviais em meios ricos em

sulfetos<sup>1,108</sup> por exemplo. Apesar das hemoglobinas de invertebrados apresentarem significativas semelhanças com as hemoglobinas de vertebrados, suas sub-unidades se organizam de maneira diferente. As hemoglobinas extracelulares são formadas por cadeias globínicas, que apresentam massa molecular de 15-19 kDa, e cadeias *linkers*, que possuem massa molecular em torno de 22-27 kDa.<sup>108</sup> Bruschi<sup>112</sup> encontrou para as cadeias *linkers* da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* as seguintes massas moleculares: 22, 26, 27 e 30 kDa.

Em suma, a hemoglobina (Hb) extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* é uma hemoproteína oligomérica.<sup>113</sup> Essa configuração espacial final, que consiste na estrutura quaternária da proteína, é chamada “modelo do bracelete”, sendo que tal arquitetura é suportada por microscopia crioeletrônica.<sup>107,110,114</sup> Por outro lado, apesar de ser pertencente à mesma classe do anelídeo *Lumbricus terrestris*, que vem sendo intensamente estudado por diversas técnicas,<sup>115-120</sup> a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* permanece intrigante sob vários aspectos da sua relação estrutura/atividade.

A massa supramolecular da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* assim como a disposição de suas sub-unidades no arranjo oligomérico ainda permanece controversa.<sup>121</sup> Esta hemoglobina apresenta em sua estrutura quaternária, segundo os dados mais aceitos, 144 cadeias de globinas e 36 cadeias estabilizadoras da estrutura em questão, chamadas cadeias *linkers*, que são cruciais para sua integridade estrutural<sup>108,122</sup> e que podem estar associadas a uma atividade superóxido dismutase.<sup>123</sup> Assim sendo, a estequiometria da hemoglobina íntegra é representada como [(abcd)<sub>3</sub>L<sub>3</sub>]<sub>12</sub>,<sup>116</sup> cujas cadeias estão dispostas como dois discos hexagonais sobrepostos, apresentando as sub-unidades *linkers* ou cadeias “L”, que não apresentam grupamentos heme na parte central do arranjo supramolecular<sup>6</sup> e as cadeias *a*, *b*, *c*, e *d*, que contêm grupos heme, nos vértices dos hexágonos. Estudos de Vinogradov<sup>4</sup> mostram que as cadeias *linkers* da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* apresentam uma distribuição assimétrica, responsável pelo expressivo momento de dipolo desse sistema macromolecular. As sub-unidades estão arranjadas como doze dodecâmeros, sendo que cada um deles é constituído por três tetrâmeros. O dodecâmero consiste de três trímeros, que são as cadeias monoméricas *a*, *b*, *c* ligadas por ligações de dissulfeto, e três cadeias monoméricas *d*.<sup>6,118</sup>

A partir da obtenção, através de cálculos de homologia, do modelo do monômero *d*,<sup>124</sup> que apresentou 54% de identidade estrutural em relação à cadeia monomérica de *Lumbricus terrestris*, buscou-se o estudo da reconstituição do mesmo monômero objetivando-se a compreensão mais ampla das propriedades físico-químicas do monômero *d* nativo, bem como o conhecimento das características do mesmo monômero reconstituído.<sup>125</sup> Essa hemoglobina extracelular, quando em seu estado íntegro, apresenta estabilidade estrutural e redox significativamente maiores do que as hemoglobinas intracelulares como, por exemplo, a hemoglobina humana, o que não deixa de tornar a avaliação dos fatores que controlam esse comportamento altamente relevante não só para o estudo desta hemoglobina gigante propriamente considerada, como igualmente, para proporcionar um melhor entendimento das hemoglobinas em geral.

Vale destacar a correlação entre a primeira esfera de coordenação e as conformações espaciais adquiridas pela globina em função desta primeira variável. Esta relação pode ser ilustrada, por exemplo, pelo trabalho de Zhu e colaboradores,<sup>111</sup> que estabelece que o trímero de *Lumbricus terrestris* apresentando o centro de coordenação no estado de oxidação +2 (coordenado pelo CO) se reorganiza com o monômero com o centro metálico no estado de oxidação +3, reconstituindo o tetrâmero e que tal rearranjo não ocorre com o trímero na forma meta (estado férrico) e o monômero na forma carbonil (estado ferroso). Estes autores asseveram que determinados ligantes como cianeto, por exemplo, induzem a reorganização oligomérica da hemoglobina íntegra a partir de sub-unidades inicialmente dissociadas.<sup>111</sup> Vários

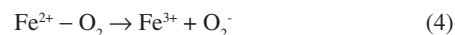
trabalhos na literatura têm buscado contribuir na química de hemoproteínas correlacionando as propriedades do complexo ferro-porfirínico com as características espaciais de toda a sub-unidade.<sup>6</sup>

Em resumo, os estados de organização da hemoglobina íntegra são dependentes tanto do estado de oxidação do centro de coordenação da porfirina como dos ligantes axiais,<sup>62</sup> o que é corroborado, inclusive, por trabalhos anteriores de nosso grupo envolvendo a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.<sup>126-128</sup> Riggs e colaboradores<sup>62</sup> têm proposto que hemoglobinas de invertebrados em geral apresentam mudanças conformacionais dependentes dos ligantes, com mecanismos de cooperatividade diferentes daqueles encontrados nos vertebrados.

É importante ressaltar que a hemoglobina gigante de *Lumbricus terrestris* já foi empregada como transportador de oxigênio em sangue artificial com resultados promissores,<sup>10</sup> o que poderia ser uma possível aplicação para a própria hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, haja vista o alto custo dos trabalhos sintéticos que visam a formação de substitutos para o sangue e as vantagens naturais de uma hemoproteína que evoluiu durante o curso da seleção natural<sup>10</sup> em relação aos compostos elaborados por vias sintéticas. Além disso, a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, tendo-se em vista todas as suas propriedades anteriormente discutidas, não deixa de ser um protótipo para aplicações como biossensor, requisitando para essa finalidade um conhecimento substancial de suas características específicas, tanto em relação ao bolsão do heme como em se tratando das cadeias polipeptídicas.

#### A auto-oxidação da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*

A oxidação do centro ferroso do grupo heme para o estado trivalente leva à formação da espécie denominada meta-hemoglobina. Após esta oxidação, o íon de ferro não pode mais formar complexo com o oxigênio, pois o ligante oxigênio não tem afinidade pelo íon férrico. A meta-hemoglobina pode ser obtida pela exposição de alguns derivados ferrosos a um oxidante como ferricianeto ou pode ser formada espontaneamente, a partir da proteína oxigenada nativa. Este fenômeno ocorre também *in vivo* e é responsável pela presença de aproximadamente 0,5% de meta-hemoglobina nas células vermelhas do sangue.<sup>129</sup>



O ramo superior do esquema envolvendo as espécies originadas pela auto-oxidação representa a ligação reversível da molécula de oxigênio ao íon ferroso (3). Entretanto, pode ocorrer também a dissociação espontânea do oxigênio na forma do ânion superóxido, descrito pela Equação 4. Esta dissociação implica na redução do oxigênio à custa da oxidação do ferro. Esta transformação das hemoglobinas e das mioglobinas é denominada de auto-oxidação.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para se obter hemoproteínas recombinantes que apresentem uma boa estabilidade contra a auto-oxidação, mantendo uma baixa afinidade pelo oxigênio e alta cooperatividade.<sup>130-132</sup> Estes fatores são importantes para carregadores eficientes.

Deve-se registrar que a oxidação *in vivo* atinge percentual superior a 0,5%, somente sendo mantida em valores menores ou iguais a 0,5% em função da atuação de mecanismos de redução enzimática. De fato, nas células vermelhas e nos tecidos musculares estão presentes o NADH-citocromo b<sub>5</sub> oxidoreductase, que reduz a meta-hemoglobina ou a meta-mioglobina para a sua forma deoxi ferrosa novamente.

Esta redução previne a acumulação da forma meta *in situ*. As

enzimas em questão são denominadas meta-hemoglobina redutase e meta-mioglobina redutase, respectivamente. Estas enzimas apresentam o grupo FAD que recebe elétrons do NADH. De fato, a forte redução cíclica das espécies férricas (Fe(III)) por estas enzimas é a base para o desempenho das funções tanto da hemoglobina como da mioglobina *in vivo*, sendo que a reação de auto-oxidação é inevitável na natureza para todas as hemoproteínas que ligam oxigênio, assim como para os carregadores sintéticos.<sup>133</sup>

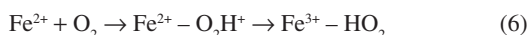
O nível da meta-hemoglobina em algumas condições patológicas pode aumentar consideravelmente. Esta situação pode ser atribuída a um defeito congênito da redutase cistólica ou às anormalidades na estrutura da hemoglobina.<sup>129</sup>

A hemoglobina humana exhibe velocidades de auto-oxidação não equivalentes para as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  como função do pH. A não equivalência na velocidade de auto-oxidação destas cadeias ocorre em meio ácido, enquanto que em valores de pH maiores que 8,5 a auto-oxidação é equivalente. A velocidade de auto-oxidação das cadeias  $\alpha$  é maior que a velocidade das cadeias  $\beta$ . Isto ocorre porque as cadeias  $\alpha$  são mais sensíveis ao processo de auto-oxidação, devido à separação rápida das mesmas em relação ao restante da hemoglobina parcialmente oxidada.<sup>134,135</sup> Consta-se um aumento de 17 vezes na velocidade de auto-oxidação quando a hemoglobina se dissocia em dímeros  $\alpha\beta$ , em concentrações baixas de hemoglobina, pois estes dímeros são mais sensíveis à auto-oxidação quando comparados à forma tetramérica.<sup>84</sup>

Detalhes do mecanismo desta reação de auto-oxidação são de interesse químico e clínico e têm sido estudados por muitos autores. A facilidade para a auto-oxidação ocorrer varia substancialmente de proteína para proteína e alguns fatores como pH, pressão de oxigênio, presença de ligantes e dissociação da proteína podem influenciar na velocidade desse processo.<sup>84,133</sup> Gonzalez e colaboradores<sup>136</sup> apresentaram três possíveis mecanismos para a reação de auto-oxidação de proteínas:

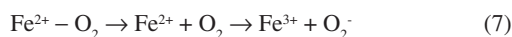
#### Dissociação do superóxido protonado a partir do oxi-heme

Este mecanismo de auto-oxidação prevalece em condições saturadas de oxigênio, sendo dependente do pH. O oxigênio ligado ao heme é dissociado como ânion superóxido a partir do oxi-heme protonado e a velocidade da auto-oxidação, por sua vez, aumenta com a diminuição do pH (Equações 5 e 6).



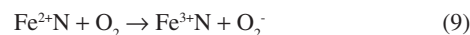
Transferência de elétron por esfera externa do intermediário pentacoordenado desoxi-heme

O mecanismo de esfera externa não requer a dissociação do ânion superóxido a partir do complexo oxi-heme, sendo que a transferência do elétron do ferro para o oxigênio ocorre a partir do complexo deoxi-heme, isto é, do complexo pentacoordenado ferroso (Equação 7). Este mecanismo de transferência de elétron por esfera externa não depende do pH.



#### Transferência de elétron por esfera externa do intermediário desoxi-heme hexacoordenado

A reação de transferência de elétrons por ligantes é mediada por duas etapas. Primeiramente, um nucleófilo N, por exemplo, a água, se liga à mioglobina ferrosa (Equação 8) e, em seguida, o heme ferroso hexacoordenado transfere um elétron para o oxigênio, via mecanismo de esfera externa (Equação 9).



Alguns trabalhos envolvendo mioglobina e hemoglobina<sup>137</sup> descrevem uma proposta para o mecanismo de auto-oxidação na presença de ligantes. Nestes trabalhos, é observado um aumento na velocidade de auto-oxidação na presença de quantidades excessivas de ânions, tais como  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{OCN}^-$ ,  $\text{F}^-$ . Sugere-se que a reação se processe por um caminho de deslocamento redutivo do oxigênio como  $\text{O}_2^-$  da hemoglobina pelos ânions, ocorrendo a oxidação do centro ferroso concomitantemente, através de um ataque nucleofílico dos ânions ao metal.

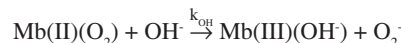
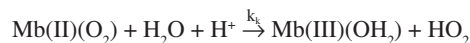
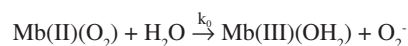
Em condições fisiológicas, o processo elementar envolvido na reação de auto-oxidação (Equação 10) pode ser observado como um mecanismo de substituição nucleofílica  $\text{S}_{\text{N}}2$ , onde  $\text{X}^-$  pode ser  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{OCN}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  ou  $\text{CN}^-$ , além de  $\text{H}_2\text{O}$  *in vivo*.<sup>65,137</sup>



Os ligantes que atuam como nucleófilos na reação acima apresentam elevada afinidade pelo centro de coordenação no estado férrico e baixa afinidade por este centro metálico no estado ferroso.<sup>138,139</sup> Isto ocorre em função da alta densidade de carga eletrônica destes ligantes, que, à exceção do ligante água, são ligantes aniônicos. Considerando que o centro ferroso apresenta uma configuração eletrônica  $d^6$  e o centro férrico  $d^5$ , é compreensível a maior estabilidade dos complexos formados entre estes ligantes e o centro férrico, que é um ácido mais poderoso que o centro ferroso. Realmente, a repulsão eletrônica deve ser bem mais intensa na interação entre estes ligantes e o íon ferroso.<sup>140</sup>

A reação de auto-oxidação da espécie oxi-mioglobina para a espécie meta-mioglobina pode ser explicada por três diferentes processos de deslocamento dependentes do pH.

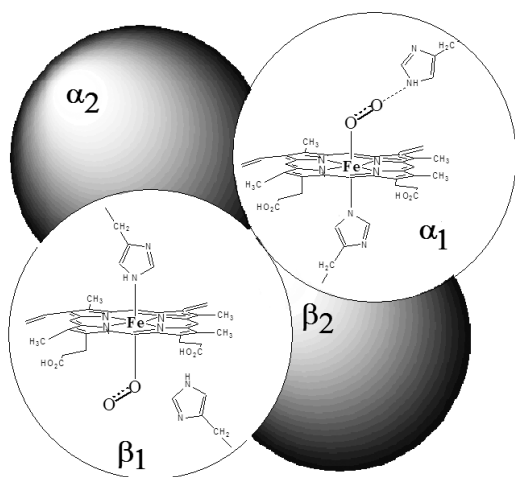
As três equações justapostas representam a sequência de reações associadas ao processo de auto-oxidação. Em uma primeira etapa, ocorre uma reação espontânea através da substituição redutiva do oxigênio pela água. A seguir, ocorre a substituição do oxigênio pela hidroxila. Na catálise por próton, que acontece na fase final, a histidina forma ligação de hidrogênio com o oxigênio, facilitando o movimento do catalisador do solvente para o oxigênio, através do imidazol, por um mecanismo de substituição de prótons, sendo que o nucleófilo é a própria água.



A auto-oxidação da cadeia  $\beta$ , em especial no dímero  $\alpha\beta$ , é mais resistente à catálise por próton, devido a um afastamento da histidina do oxigênio, impedindo a formação da ligação de hidrogênio e prevenindo a transferência do próton. Este processo é diferente daquele relacionado à cadeia  $\alpha$ , onde a catálise por próton, envolvendo o resíduo de histidina distal, é muito evidente (Figura 5).

#### A configuração eletrônica dos grupos heme férricos para os sistemas baixo spin

Neste trabalho será focado o estado de oxidação +3 para o ferro, ou seja, estudado um sistema  $d^5$ . Sob condições fisiológicas,



**Figura 5.** Representação esquemática do contato  $\alpha_1\beta_1$ , com destaque para a orientação do oxigênio em relação à histidina distal. No caso da cadeia  $\alpha$ , essa referida orientação espacial permite a formação efetiva de uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do imidazólio da histidina distal, o que não ocorre com a cadeia  $\beta$ , nesta ilustração. Essa diferenciação está associada à inclinação na histidina distal da cadeia  $\beta$  da hemoglobina humana

a meta-hemoglobina é formada por auto-oxidação espontânea e o equilíbrio redox é deslocado para a forma reduzida pelo sistema meta-hemoglobina redutase.<sup>141</sup> Além disso, estudos da forma férrica têm avançado significativamente na compreensão das bases estruturais da transição cooperativa em hemoglobinas. Recentemente, foi demonstrado que a formação *in vivo* de meta-hemoglobina pode ser resultado da interação com NO.

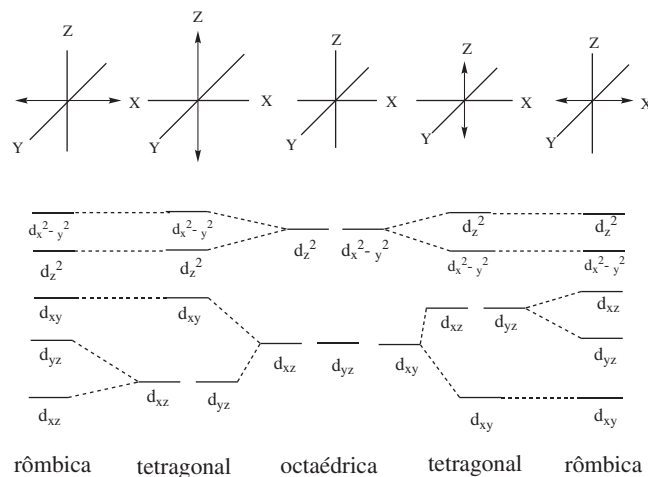
As meta-hemoglobinas são usadas para estudar vários ligantes diferentes como, por exemplo, cianeto, que apresenta baixa afinidade pelo centro ferroso,<sup>86</sup> e, igualmente, em trabalhos visando a compreensão do mecanismo de controle alostérico.<sup>141</sup> Hemoproteínas no estado férrico frequentemente representam o sistema de escolha para o estudo da reatividade do heme em relação a ligantes carregados tanto para investigações sobre propriedades de spin do íon metálico quanto em resposta a perturbações conformacionais.<sup>142</sup> De qualquer maneira, a atribuição tanto do estado de coordenação como da natureza do ligante coordenado no sexto sítio de coordenação é um pré-requisito para tais estudos.<sup>142</sup>

Em hemoproteínas, distorções assimétricas do macrociclo porfirínico são induzidas por ligantes axiais,<sup>143-145</sup> substituintes periféricos assimétricos<sup>145,146</sup> e pela anisotropia do ambiente proteico.<sup>145</sup>

Segundo Walker,<sup>98,147,148</sup> partindo-se dos grupos ferro-porfirínicos, clorinas e tetrafenilporfirinas com substituições diversificadas, entre elas, piridinas, pirazóis e imidazóis como ligantes axiais, identificam-se três tipos de centros ferro-porfirínicos com configurações eletrônicas de baixo spin: a) Tipo I, que apresenta o estado fundamental eletrônico  $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$  e ligantes axiais alinhados em planos reciprocamente perpendiculares, ou seja, com os ligantes axiais em planos mutuamente ortogonais. Desta maneira, o ligante proximal estaria em uma orientação ortogonal em relação ao ligante distal. b) Tipo II, que apresenta o estado fundamental eletrônico  $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^3$  e ligantes axiais alinhados em planos reciprocamente paralelos, ou seja, com os ligantes axiais apresentando seus planos imidazólicos em uma orientação mutuamente paralela. Assim, o ligante proximal estaria em uma orientação paralela em relação ao ligante distal. c) Tipo III, que apresenta o estado fundamental eletrônico  $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$  com os ligantes axiais em quaisquer orientações.<sup>147</sup>

Portanto, existem dois tipos de configuração eletrônica para complexos porfirínicos de ferro(III) baixo spin, a configuração eletrônica  $(d_{xy})^2(d_{xz},$

$d_{yz})^3$ , que apresenta uma ligeira distorção na classe Tipo I,<sup>96,147,149,150</sup> e uma conformação planar para a classe Tipo II, a configuração  $(d_{xz}, d_{yz})^4(d_{xy})^1$ , que constitui um arranjo eletrônico encontrado na porfirina significativamente distorcida ou ondulada. Em princípio, pode-se dizer que as variáveis que determinam a configuração eletrônica da porfirina são: os ligantes axiais, o solvente<sup>147,151</sup> e as interações estéricas. Em verdade, o estudo das diferentes conformações tem obtido atenção de muitos grupos de pesquisa há várias décadas,<sup>152</sup> mas só recentemente, com a maior disseminação das técnicas magnéticas (tais como, RMN, RPE, DCM), é que este assunto tem sido mais intensamente explorado, permitindo observações mais conclusivas e esclarecedoras sobre a relação entre a conformação do anel, o desdobramento dos orbitais *d* e o estado de spin eletrônico (Figura 6).



**Figura 6.** Desdobramento dos orbitais 3d de complexos octaédricos devido às distorções tetragonais e romboédricas. À direita: o preenchimento assimétrico dos orbitais  $d_{xz}$  e  $d_{yz}$  intensifica as distorções de Jahn-Teller gerando a simetria romboédrica. A simetria tetragonal é favorecida na ausência de impedimentos espaciais

O fato da porfirina desenvolver diversas funções em biologia é uma clara evidência da influência do ambiente proteico sobre suas propriedades.<sup>153</sup> Segundo Marques e Brown,<sup>153</sup> um dos mais significativos desenvolvimentos na química das porfirinas nos últimos 20 anos consiste nos estudos focados na flexibilidade do anel porfirínico. Recentemente, uma vasta literatura vem sendo publicada abordando as conformações do anel porfirínico, as relações com a configuração de spin eletrônico do centro férrico, suas implicações físico-químicas como reatividade e potencial redox e repercussões espectroscópicas nas várias técnicas empregadas.<sup>137,146,154-158</sup> Dentre estas técnicas, vale mencionar o emprego amplamente difundido da ressonância magnética nuclear (RMN), fazendo uso, no caso do centro férrico (Fe(III)), do acoplamento hiperfino para sondar a conformação e as circunvizinhanças do anel porfirínico. O emprego desta técnica espectroscópica para avaliar a interação hiperfina abrange os núcleos dos ligantes axiais, os núcleos do anel porfirínico e também a interação com o spin nuclear dos núcleos pertencentes aos resíduos de aminoácidos formadores dos limites da cavidade do bolsão hidrofóbico do heme.<sup>159-182</sup>

A elucidação da relação entre a não planaridade porfirínica e a configuração eletrônica do centro férrico é extremamente relevante, desde que estudos cristalográficos de hemoproteínas têm revelado que os hemes nas cavidades proteicas, em vários casos, não são planares. A título de ilustração, podem-se citar os seguintes exemplos de hemoproteínas que revelam o grupamento prostético distorcido de uma simetria  $D_{4h}$  ideal, caracterização obtida via raios-X: citocromo *c*3; citocromo *c* de atum, oxidado e reduzido; citocromo *c* peroxidase, iso-1-citocromo *c* de leveduras.<sup>144</sup>



Apesar do fato dos efeitos da distorção do anel porfirínico nas propriedades físico-químicas dos complexos estarem sendo amplamente estudados, incluindo propriedades espectroscópicas e redox, poucos estudos sistemáticos têm sido elaborados sobre a relação entre configuração eletrônica do ferro e a não planaridade do anel porfirínico.<sup>160</sup> A necessidade da compreensão dessa correlação deve ser ressaltada, haja vista as evidências da influência da deformação porfirínica na dissociação do ligante oxigênio de ferro(II)-porfirinas,<sup>183</sup> o que nos faz remontar à relação estrutura/atividade das hemoproteínas. Deve-se, igualmente, fazer alusão ao fato de que a distorção não é única, podendo se apresentar de formas variadas e, por consequência, com propriedades peculiares correspondentes a cada uma delas.<sup>184</sup>

Em complexos modelos, uma configuração distorcida ocorre se uma das condições seguintes é satisfeita: os ligantes axiais serem, ao mesmo tempo, fracos  $\sigma$ -doadores e fortes  $\pi$ -receptores, tais como *tert*-butil isocianeto (BuNC) e 4-cianopiridina (4-CNPy),<sup>163,185</sup> os anéis porfirínicos serem fortemente  $S_4$ -distorcidos, tais como *meso*-tetraisopropilporfirina, *meso*-tetrametilquiroporfirina e *meso*-tetraciclo-hexilporfirina.<sup>163</sup>

Considerando-se que o bolsão do heme e a significativa influência mecânica das cadeias polipeptídicas podem funcionar nas hemoproteínas como os impedimentos estéricos nos complexos metálicos, as mudanças conformacionais das cadeias polipeptídicas, ocasionadas pela alteração de pH, poderiam ser um fator desencadeador da mudança conformacional do anel porfirínico.

Estudos têm demonstrado que o solvente também desenvolve importante função na determinação do estado fundamental.<sup>151</sup> Uma das propriedades dos solventes geradora dessa diferenciação na configuração eletrônica das porfirinas consiste na maior ou menor potencialidade de constituição de ligações de hidrogênio. Por exemplo, o cianeto ao formar ligações de hidrogênio tem sua habilidade  $\sigma$ -doadora enfraquecida e seu caráter  $\pi$ -receptor fortalecido.<sup>151</sup> Apesar do fato deste trabalho enfocar apenas o meio aquoso em função do seu objetivo biológico, esta influência do solvente pode ser significativa nas propriedades do heme, considerando-se que o conhecido ambiente hidrofóbico da cavidade que o contém ser mais ou menos afetado pelas alterações das condições do meio como, por exemplo, o pH.

Em um sistema onde não se alteram os substituintes porfirínicos, como é o caso da hemoglobina estudada neste trabalho, os ligantes axiais são determinantes nas propriedades de todo o macrociclo, não apenas o tipo de ligante e suas propriedades, mas também sua disposição espacial.<sup>186-188</sup> Vale acrescentar que apesar da grande utilidade de hemes modelos na elucidação das propriedades das hemoproteínas, os hemes sintéticos, frequentemente, introduzem diferentes propriedades como, por exemplo, a rápida rotação dos ligantes axiais em soluções homogêneas, quando não são inseridos nos complexos impedimentos estéricos que impeçam essa livre movimentação. Quando a rotação é livre, os complexos em solução se diferenciam significativamente das proteínas no que se refere às propriedades espectroscópicas, o que tem sido a justificativa de muitos estudos que desconsideram a anisotropia das interações hiperfinas em ressonância magnética nuclear de complexos.<sup>189</sup> Nas hemoproteínas, essa livre rotação é impedida por ligações covalentes, impedimentos estéricos e ligações de hidrogênio,<sup>190</sup> o que torna o estudo das hemoproteínas propriamente consideradas imprescindível para a compreensão das ferroporfirinas nos sistemas biológicos. A orientação dos ligantes axiais, sendo fundamental para o desdobramento dos orbitais moleculares, é também determinante para suas consequências espectroscópicas e magnéticas, sendo, portanto, um pré-requisito para a interpretação dos dados provenientes das espectroscopias magnéticas.<sup>171,191</sup> Além disso, normalmente as hemoproteínas apresentam equilíbrios químicos mais complexos do que os compostos de coordenação férrico-porfirínicos modelos em função da influência efetiva que as cadeias polipeptídicas exercem nos mecanismos de troca de ligantes.

Deve-se observar que os estados distorcidos e planares podem se apresentar dinâmicos e interconversíveis, ou seja, eles mesmos podem constituir um equilíbrio químico, o que é evidenciado por espectros de RPE (ressonância paramagnética eletrônica) com características tanto de uma como de outra conformação.<sup>151</sup> Essa interconversibilidade pode ser mais ou menos pronunciada, dependendo, em primeira instância, das peculiaridades estéricas do sistema químico, sendo que, via de regra, quanto mais distorcido, menor a interconversibilidade molecular porque mais obstruído se encontra o macrociclo.<sup>94</sup>

Além da interconversão entre espécies, o próprio anel porfirínico pode apresentar um equilíbrio químico entre duas orientações nas hemoproteínas, o que é consequência de uma interconversão de 180°, afetando, por exemplo, o espectro de RMN <sup>1</sup>H (ressonância magnética nuclear de hidrogênio). Isto se deve à assimetria das vizinhanças do heme dentro de um enovelamento proteico, que impede uma completa interconversão das disposições do heme pela rotação.<sup>54, 94,192</sup> Esta distorção depende, inclusive, do volume do centro metálico,<sup>193</sup> mas, como no presente trabalho se estuda um único estado de oxidação de um único elemento químico, que é o ferro, esse fator não é alterado.

Segundo a literatura, excetuando-se o *n*-metilimidazol, as constantes de equilíbrio de ligantes são bem diferenciadas para os estados de oxidação ferro(II) e ferro(III).<sup>194</sup> Para tornar mais didática essa diferenciação, poderia ser citado o conceito ácido-base de Pearson, que classifica o ferro no estado de oxidação férrico (III) como sendo um ácido duro, no estado ferroso (II) como sendo *borderline* (intermediário ou limítrofe) e no invulgar estado de oxidação um (I) como sendo um ácido mole.<sup>195,196</sup> De qualquer maneira, é interessante notar que o *n*-metilimidazol, que é semelhante estruturalmente ao resíduo de histidina, apresenta afinidade similar em relação aos centros férricos e ferrosos, em função das possíveis implicações que o estudo de um estado de oxidação poderia apresentar em relação ao outro estado.

É importante salientar que as propriedades catalíticas de ferroporfirinas são dependentes dos *meso*-substituintes no anel porfirínico, do solvente, da presença de água ou íons hidroxila no meio reacional, entre outros fatores<sup>197</sup> e esses são os mesmos fatores que são fundamentais na definição de uma conformação do sistema ferro-porfirínico, pressupondo uma significativa correlação entre reatividade e distorção do anel. De fato, cálculos quânticos de metaloporfirinas envolvendo, especificamente, porfirinas de níquel mostram que a combinação de cálculos de mecânica molecular com os cálculos INDO/CI podem precisamente prever as transições  $\pi$ - $\pi^*$ . Entretanto, em muitos cálculos de orbitais moleculares, estruturas planares de porfirinas são utilizadas e os substituintes periféricos corretos não são incluídos, isto é, hidrogênios são geralmente usados no lugar dos substituintes reais para simplificar o cálculo. No entanto, os substituintes corretos necessitam ser incluídos para se produzir cálculos com boa concordância com as tendências espectrais, pois se empregando uma porfirina de geometria incorreta os cálculos de orbitais moleculares, mesmo com os substituintes corretos, proporcionam uma pobre concordância com o espectro de absorção.<sup>19,198</sup>

## CONCLUSÕES

Segundo Vinogradov,<sup>4</sup> as hemoglobinas extracelulares gigantes constituem o ápice de complexidade em hemoproteínas. A opinião deste *expert* na área merece nossa corroboração. De fato, sob vários aspectos em que seja analisada, a hemoglobina extracelular gigante é um sistema supramolecular biológico com propriedades extraordinárias que a credenciam como protótipo para sangue artificial e biossensores. Ademais, devido às suas excepcionais estabilidades redox e oligomérica, esta classe de hemoglobina pode ser considerada um sistema modelo para estudos comparativos envolvendo outras hemoproteínas. Novos estudos vêm sendo desenvolvidos visando o desenvolvimento de aplicações tecnológicas dessa macromolécula biológica e brevemente serão publicados.

## AGRADECIMENTOS

L. M. Moreira agradece às bolsas de doutorado (Orientação do Prof. Dr. H. Imasato) e pós-doutorado (Supervisão do Prof. Dr. M. Tabak) concedidas pelo CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Bailly, X.; Vinogradov, S.; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 142.
- Meirelles, N. C.; Oliveira, B.; Oliveira, A. R.; De Paula, E.; Marangoni, S.; Rennebeck, G. M.; *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **1987**, *88*, 377.
- Kitagawa, T.; Chihara, S.; Fushitani, K.; Morimoto, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1860.
- Vinogradov, S. N.; *Micron* **2004**, *35*, 127.
- Kuchumov, A. R.; Taveau, J. C.; Lamy, J. N.; Wall, J. S.; Weber, R. E.; Vinogradov, S. N.; *J. Mol. Biol.* **1998**, *289*, 1361.
- Royer, W. E.; Knapp, J. E.; Strand, K.; Heaslet, H. A.; *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 297.
- Strand, K.; Knapp, J. E.; Bhyravhatia, B.; Royer Jr, W. E.; *J. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 119.
- Madura, J. D.; Salter, E. A.; Wierzbicki, A.; Dalal, P.; Harrington, J. P.; *J. Mol. Struct.* **2002**, *592*, 173.
- Dorman, S. C.; Harrington, J. P.; Martin, M. S.; Johnson, T. V.; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 185.
- Hirsh, R. E.; Jelicks, L. A.; Wittenberg, B.; Kaul, D. K.; Shear, H. L.; Harrington, J. P.; *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1997**, *25*, 429.
- Ackers, G. K.; Doyle, M. L.; Myers, D.; Daugherty, M. A.; *Science* **1992**, *255*, 54.
- Sugimoto, H.; Makino, M.; Sawai, H.; Kawada, N.; Yoshizato, K.; Shiro, Y.; *J. Mol. Biol.* **2004**, *339*, 873.
- Izadi, N.; Henry, Y.; Haladjian, J.; Goldberg, M. E.; Wandersman, C.; Delepiepierre, M.; Lecroisey, A.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 7050.
- Clarke, T. A.; Dennison, V.; Seward, H. E.; Burlat, B.; Cole, J. A.; Hemmings, A. M.; Richardson, D. J.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41333.
- Longa, S. D.; Amiconi, G.; Salah, O. A.; Ascione, I.; Barteri, M.; Bertollini, A.; Bianconi, A.; Castellano, A. C.; *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1294*, 72.
- Poli, A. L.; Moreira, L. M.; Hidalgo, A. A.; Imasato, H.; *Biophys. Chem.* **2005**, *114*, 253.
- Cardillo, F.; De Paula, E.; Oliveira, G. R.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Meirelles, N. C.; *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, *41*, 497.
- Viola, F.; Aime, S.; Coletta, M.; Desideri, A.; Fasano, M.; Paoletti, S.; Tarricone, C.; Ascenzi, P.; *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *62*, 213.
- Bertini, I.; Gray, H.; Lippard, S. J.; Valentine, J. S.; *Bioinorganic Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed., University Science Books: Mill Valley, 1994.
- Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; *Inorganic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press: Oxford, 1999.
- Bakhtiar, R.; Ochiai, E.; *Ge Pharmacol.* **1999**, *32*, 525.
- Ward, M. S.; Shepherd, R. E.; *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *286*, 197.
- Stadler, E.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1988.
- Vu, B. C.; Jones, A. D.; Lecomte, J. T. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8544.
- Milgrom, L. R.; *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press: Oxford, 1997.
- Lindoy, L. F.; *Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, 1<sup>st</sup> ed., Cambridge University Press: Cambridge, 1989.
- Nakamoto, K.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *226*, 153.
- Baron, C. P.; Skibsted, L. H.; Andersen, H. J.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 549.
- Ozaki, S.; Matsui, T.; Roach, M. P.; Watanabe, Y.; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *198*, 39.
- Fuji, H.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *226*, 51.
- Momenteau, M.; Reed, C. A.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659.
- Duff, S. M. G.; Wittenberg, J. B.; Hill, R. D.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16746.
- Yushmanov, V. E.; *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1713.
- Santiago, P. S.; Gandini, S. C. M.; Tabak, M.; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2005**, *9*, 94.
- Moreira, L. M.; Santos, F. V.; Lyon, J. P.; Maftoum, M.; Pacheco-Soares, C.; da Silva, N. S.; *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 741.
- Berlin, K.; Jain, R. K.; Richert, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *61*, 107.
- Gandini, S. C. M.; Yushmanov, V. E.; Borissevitch, I. E.; Tabak, M.; *Langmuir* **1999**, *15*, 6233.
- Hidalgo, A. A.; Tabak, M.; Oliveira Jr., O. N.; *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *134*, 97.
- Prieto, T.; Nascimento, O. R.; Tersariol, I. L. S.; Faljoni-Alario, A.; Nantes, I. L.; *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 11124.
- Santiago, P. S.; Moreira, L. M.; Tabak, M.; *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1715.
- Harris, D.; Loew, G.; Waskell, L.; *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 309.
- Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Oliveira Jr., O. N.; *Synth. Met.* **2003**, *137*, 945.
- Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Oliveira Jr., O. N.; *Sens. Actuators, B* **2006**, *100*, 113.
- Fedurco, M.; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263.
- Gaffo, L.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Aroca, R. F.; Oliveira Jr., O. N.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2004**, *60*, 321.
- Magalhães, J. L.; Moreira, L. M.; Rodrigues-Filho, U. P.; Giz, M. J.; Pereira-Da-Silva, M. A.; Landers, R.; Vinhas, R. C. G.; Nascente, P. A. P.; *Surf. Interface. Anal.* **2002**, *33*, 293.
- Andresa, J. S.; Moreira, L. M.; Magalhães, J. L.; Gonzalez, E. P.; Landers, R.; Rodrigues-Filho, U. P.; *Surf. Interface. Anal.* **2004**, *36*, 1214.
- Castellani, A. M.; Gushikem, Y.; *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *230*, 195.
- Moreira, L. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
- Araki, K.; Toma, H. E.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 962.
- Toma, H. E.; Araki, K.; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *196*, 307.
- Wohnrath, K.; Dinelli, L. R.; Mello, S. V.; Constantino, C. J. L.; Leblanc, R. M.; Batista, A. A.; Oliveira Jr., O. N.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2005**, *6*, 909.
- La Mar, G. N.; Toi, H.; Krishnamoorthi, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6395.
- Santucci, R.; Ascoli, F.; La Mar, G. N.; Pandey, R. K.; Smith, K. M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1164*, 133.
- Larsen, R. W.; Nunez, D. J.; Macleod, J.; Shiemke, A. K.; Musser, S. M.; Nguyen, H. H.; Ondrias, M. R.; Chan, S. I.; *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *48*, 21.
- Jianyu, L.; Yuanzong, L.; *J. Mol. Catal. A* **2004**, *222*, 75.
- Teraoka, J.; Yamamoto, N.; Matsumoto, Y.; Kyogoku, Y.; Sugeta, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8875.
- Ribelatto, J. C.; Poli, A. L.; Moreira, L. M.; Imasato, H.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 829.
- Moreira, I.; Sun, J.; Cho, M. O. K.; Wishart, J. F.; Isied, S. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8396.
- Walker, F. A.; Benson, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5530.
- Edelstein, S. J.; *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 737.
- Riggs, A. F.; *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*, 1073.
- Perutz, M. F.; Fermi, G.; Luisi, B.; Shaanan, B.; Liddington, R. C.; *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 309.
- Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A.; Rybak-Akimova, E. V.; Buchalova, M.; Busch, D. H.; *Biochemistry* **1998**, *37*, 10188.
- Shikama, K.; *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1357.
- Tajima, G.; Shikama, K.; *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12603.

67. Nakano, T.; Ohto, K.; Okafuji, F.; Mori, Y.; Kakuda, H.; Hatanaka, Y.; Masuoka, N.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 703.
68. Lecomte, J. T. J.; Vuletich, D. A.; Christie Vu, B.; Kuriakose, S. A.; Scott, N. L.; Falzone, C. J.; *Micron* **2004**, *35*, 71.
69. Cianetti, S.; N egrierie, M.; Vos, M. H.; Martin, J.; Kruglik, S. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13932.
70. Estevam, M. L.; Nascimento, O. R.; Baptista, M. S.; Di Mascio, P.; Prado, F. M.; Faljoni-Alario, A.; Zucchi, M. R.; Nantes, I. L.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39214.
71. Andrew, C. R.; George, S. J.; Lawson, D. M.; Eady, R. R.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 2353.
72. Robson, N.; Brittain, T.; *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *64*, 137.
73. Bolognesi, M.; Rosano, C.; Losso, R.; Borassi, A.; Rizzi, M.; Wittenberg, J. B.; Boffi, A.; Ascenzi, P.; *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1093.
74. Knapp, J. E.; Srajer, V.; Pahl, R.; Royer Jr., W. E.; *Micron* **2004**, *35*, 107.
75. Hargrove, M. S.; Brucker, E. A.; Stec, B.; Sarath, G.; Arredondo-Peter, R.; Klucas, R. V.; Olson, J. S.; Phillips Jr., G. N.; *Structure Fold* **2000**, *8*, 1005.
76. Deatherage, J. F.; Obendorf, S. K.; Moffat, K.; *J. Mol. Biol.* **1979**, *134*, 419.
77. Bedioui, F.; *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 39.
78. Rosa, I. L. V.; Manso, C. M. C. P.; Serra, O. A.; Iamamoto, Y.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, *160*, 199.
79. Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Ribeiro, E. S.; Benvenutti, E. V.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *523*, 64.
80. Ribeiro, E. S.; Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 829.
81. Faria, A. L.; Airolidi, C.; Doro, F. G.; Fonseca, M. G.; Assis, M. D.; *Appl. Catal., A* **2004**, *268*, 217.
82. Fattorusso, R.; De Pasquale, C.; Morelli, G.; Pedone, C.; *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *278*, 76.
83. Li, Y.; Liu, H.; Pang, D.; *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *574*, 23.
84. Zhang, H.; Simonis, U.; Walker, F. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6124.
85. Sima, J.; Mkanova, J.; *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *160*, 161.
86. Chang, C. K.; Dolphin, D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1607.
87. El-Kasmi, D.; Tetreau, C.; Lavalette, D.; Momenteau, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6041.
88. Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Rohlf, R. J.; Mathews, A. J.; Olson, J. S.; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3057.
89. Springer, B. A.; Sligar, S. G.; Olson, J. S.; Phillips Jr., G. N.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699.
90. Allentoff, A. J.; Bolton, J. L.; Wilks, A.; Thompson, J. A.; Montellano, P. R. O.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9744.
91. Bartnicki, D. E.; Mizukami, H.; Romero-Herrera, A. E.; *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1599.
92. Suzuki, T.; Watanabe, Y.; Nagasawa, M.; Matsuoka, A.; Shikama, K.; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6166.
93. Shikama, K.; Matsuoka, A.; *Biochem.* **1986**, *25*, 3898.
94. Cheng, B.; Munro, O. Q.; Marques, H. M.; Scheidt, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10732.
95. Drew, A.; Dunitz, B. D.; Head-Gordon, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12070.
96. Smith, D. M. A.; Dupuis, M.; Vorpapel, E. R.; Straatsma, T. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2711.
97. Dickerson, L. D.; Sauer-Masarwa, A.; Herron, N.; Fendrick, C. M.; Busch, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3623.
98. Moreira, L. M.; Ribelatto, J. C.; Imasato, H.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 958.
99. Tinto, M. H.; *Disserta o de Mestrado*, Universidade de S o Paulo, Brasil, 1994.
100. Fernandez, S. P.; *Disserta o de Mestrado*, Universidade de S o Paulo, Brasil, 2001.
101. Righi, G.; *Moni. Zool. Ital.* **1972**, *6*, 19.
102. Marques, M. B.; Meirelles, N. C.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *111*, 311.
103. Brown, G. G.; Barois, I.; Lavelle, P.; *Eur. J. Soil. Biol.* **2000**, *36*, 177.
104. Rossi, J. P.; Nuutinen, V.; *Appl. Soil Ecol.* **2004**, *27*, 189.
105. Barnes, R. D.; *Invertebrate Zoology*, 4<sup>th</sup> ed., Saunders College: Philadelphia, 1980.
106. Arndt, M. H. L.; Santoro, M. M.; *Com. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *119*, 667.
107. Yamaki, M.; Kubota, K.; Matsubara, K.; Ebina, S.; Gotoh, T.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *355*, 119.
108. Zal, F.; Green, B. N.; Martineu, P.; Lallier, F. H.; Toulmond, A.; Vinogradov, S. N.; Childress, J. J.; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5227.
109. Lamy, J. N.; Green, B.; Toulmond, A.; Walls, J.; Weber, R.; Vinogradov, S.; *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3113.
110. Krebs, A.; Zipper, P.; Vinogradov, S. N.; *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1297*, 115.
111. Zhu, H.; Ownby, D. W.; Riggs, C. K.; Nolasco, N. J.; Stoops, J. K.; Riggs, A. F.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30007.
112. Bruschi, S. M.; *Monografia de Gradua o*, Universidade de S o Paulo, Brasil, 2000.
113. Costa, M. C. P.; Bonaf , C. F. S.; Meireles, N. C.; Galembeck, F.; *Braz. J. Med. Res.* **1998**, *21*, 115.
114. Green, B. N.; Vinogradov, S. N.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 22.
115. Kapp, O. H.; Polidori, G.; Mainwaring, M. G.; Crewe, A. V.; Vinogradov, S. N.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 628.
116. Martin, P. D.; Kuchumov, A. R.; Green, B. R.; *J. Mol. Biol.* **1996**, *225*, 154.
117. Viana, E.; Silva, C. H. T. P.; Tabak, M.; Imasato, H.; Garrat, R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1383*, 130.
118. Haas, F.; Kuchumov, A.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Vinogradov, S. N.; Lamy, J. N.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 102.
119. Mouche, F.; Boisset, N.; Penczek, P. A.; *J. Struct. Biol.* **2001**, *133*, 176.
120. Zipper, P.; Krebs, A.; *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2002**, *191*, 141.
121. Daniel, E.; Lustig, A.; David, M. M.; Tsfadia, Y.; *Micron* **2004**, *35*, 131.
122. Royer, W. E.; Strand, K.; Van Hell, M.; Hendrickson, W. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 7107.
123. Liochev, S. I.; Kuchumov, A. R.; Vinogradov, S. N.; Fridovich, I.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *330*, 281.
124. Cabral, C. B.; Imasato, H.; Rosa, J. C.; Laure, H. J.; Da Silva, C. H. T. P.; Tabak, M.; Garrat, R. C.; Greene, L. J.; *Biophys. Chem.* **2002**, *97*, 139.
125. Ribelatto, J. C.; Poli, A. L.; Moreira, L. M.; Imasato, H.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 666.
126. Gelamo, E. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade de S o Paulo, Brasil, 2003.
127. Gelamo, E. L.; Itri, R.; Tabak, M.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33298.
128. Agostinho, S. C. M.; Tinto, M. H.; Perussi, J. R.; Tabak, M.; Imasato, H.; *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **1997**, *118*, 171.
129. Antonini, E.; Rossi-Bernardi, L.; Chiancone, E.; *Methods in Enzymology*, 1<sup>st</sup> ed.; Academic Press: New York, 1981.
130. Brantley, Jr., R. E.; Smerdon, S. J.; Wilkinson, A. J.; Singleton, E. W.; Olson, J. S.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6995.
131. Jeong, S. T.; Ho, N. T.; Hendrich, M. P.; Ho, C.; *Biochem.* **1999**, *38*, 13433.
132. Tada, T.; Watanabe, Y.; Matsuoka, A.; Ikeda-Saito, M.; Imai, K.; Ni-Hei, Y.; Shikama, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1387*, 165.
133. Shikama, K.; Matsuoka, A.; *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4041.
134. Tsuruga, M.; Matsuoka, A.; Hachimori, A.; Sugawara, Y.; Shikama, K.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8607.
135. Tsuruga, M.; Shikama, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1337*, 96.

136. González, J. A.; Wilson, L. J.; *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1543.
137. Saitoh, T.; Ikeue, T.; Ohgo, Y.; Nakamura, M.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12487.
138. Moreira, L. M.; Poli, A. L.; Costa-Filho, A.; Imasato, H.; *Biophys. Chem.* **2006**, *124*, 62.
139. Ikeda-Saito, M.; Hori, H.; Andersson, L. A.; Prince, R. C.; Pickering, I. J.; George, G. N.; Sanders, C. R.; Lutz, R. S.; Mckelvey, E. J.; Mattern, R.; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22843.
140. Sigman, J. A.; Pond, A. E.; Dawson, J. H.; Lu, Y.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 11122.
141. Das, T. P.; Boffi, A.; Chiancone, E.; Rousseau, D. L.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2916.
142. Boffi, A.; Guarrera, L.; Giangiaco, L.; Spagnuolo, C.; Chiancone, E.; *Biochemistry* **2000**, *39*, 3500.
143. Nakamura, M.; Ikeue, T.; Ikezaki, A.; Ohgo, Y.; Fujii, H.; *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 3857.
144. Munro, O. Q.; Marques, H. M.; Debrunner, P. G.; Mohanrao, K.; Scheidt, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 935.
145. Schweitzer-Stenner, R.; Bigman, D.; *J. Phys. Chem.* **2001**, *105*, 7064.
146. Wolowicz, S.; Latos-Graznski, L.; Mazzanti, M.; Marchon, J.; *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5761.
147. Walker, F. A.; *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185*, 471.
148. Walker, F. A.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 589.
149. Zaric, S. D.; Popovic, D. M.; Knapp, E.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 7914.
150. Medakovic, V.; Zaric, S. D.; *Inorg. Chem. Acta* **2003**, *349*, 1.
151. Ikezaki, A.; Ikeue, T.; Nakamura, M.; *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *335*, 91.
152. Stone, A.; Fleisher, E. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2735.
153. Marques, H. M.; Brown, K. L.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *225*, 123.
154. Ohgo, Y.; Ikeue, T.; Nakamura, M.; *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1698.
155. Barkigia, K. M.; Chantranupong, L.; Smith, K. M.; Fajer, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7566.
156. Barkigia, K. M.; Berber, M. D.; Fajer, J.; Medforth, C. J.; Renner, M. W.; Smith, K. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8851.
157. Takeuchi, T.; Gray, H. B.; Goddard III, W. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9030.
158. Fujii, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4641.
159. Nakamura, M.; Ikeue, T.; Fujii, H.; Yoshimura, T.; Tajima, K.; *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2405.
160. Nakamura, M.; Ikeue, T.; *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 3731.
161. Guillemot, M.; Auger, N.; Simonneaux, G.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *20*, 2047.
162. Ikeue, T.; Ohgo, Y.; Saitoh, T.; Nakamura, M.; Fujii, H.; Yokoyama, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4068.
163. Ikeue, T.; Ohgo, Y.; Saitoh, T.; Yamaguchi, T.; Nakamura, M.; *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3423.
164. Goff, H. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3714.
165. Koshikawa, K.; Yamamoto, Y.; Kamimura, S.; Matsuoka, A.; Shikama, K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1385*, 89.
166. Galardon, E.; Le Maux, P.; Paul, C.; Poriel, C.; Simonneaux, G.; *J. Organomet. Chem.* **2001**, *629*, 145.
167. Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J.; *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *151*, 1.
168. Bertini, I.; Luchinat, C.; *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1.
169. Bertini, I.; Luchinat, C.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 145.
170. Wu, Y.; Basti, M.; Gambacurta, A.; Chiancone, E.; Ascoli, F.; La Mar, G. N.; *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1298*, 261.
171. Emerson, S. D.; La Mar, G. N.; *Biochemistry* **1990**, *29*, 1556.
172. Xu, A. S. L.; Macdonald, J. M.; Labotka, R. J.; London, R. E.; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1432*, 333.
173. Kolczak, U.; Han, C.; Sylvia, L. A.; La Mar, G. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12643.
174. Ney, S.; Nakamura, M.; Imai, K.; Hori, H.; Funasaki, N.; *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1296*, 245.
175. Marquez, J.; Walker, F. A.; Simonis, U.; *J. Inorg. Chem.* **1995**, *59*, 511.
176. Ma, D.; Lu, J.; Tang, W.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1384*, 32.
177. Kao, Y.; Lecomte, J. T. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9754.
178. Walker, F. A.; Nasri, H.; Turowska-Tyrk, I.; Mohanrao, K.; Watson, C. T.; Shokhirev, N. V.; Debrunner, P. G.; Scheidt, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12109.
179. Safo, M. K.; Gupta, G. P.; Watson, C. T.; Simonis, U.; Walker, F. A.; Scheidt, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7066.
180. Morishima, I.; Inubushi, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3568.
181. Lee, K.; Kweon, J.; Park, H.; *FEBS Lett.* **1995**, *367*, 77.
182. Lin, Q.; Simonis, U.; Tipton, A. R.; Norvell, C. J.; Walker, F. A.; *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4216.
183. Desbois, A.; Momenteau, M.; Lutz, M.; *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 825.
184. Senge, M. O.; Medforth, C. J.; Forsyth, T. P.; Lee, D. A.; Olmstead, M. M.; Jentzen, W.; Pandey, R. K.; Shelnut, J. A.; Smith, K. M.; *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1149.
185. Ogura, H.; Yatsunyk, L.; Medforth, C. J.; Smith, K. M.; Barkigia, K. M.; Renner, M. W.; Melamed, D.; Walker, F. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6564.
186. Astaskin, A. V.; Raitsimring, A. M.; Kennedy, A. R.; Shokhireva, T. K.; Walker, F. A.; *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 74.
187. Flint, H.; Trautwein, A. X.; Winkler, H.; Grodzicki, M.; Wright, J. L.; Polam, J. R.; Walker, F. A.; *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 493.
188. Dickinson, L. C.; Chien, J. C. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5036.
189. Timmel, C. R.; Cintolesi, F.; Brocklehurst, B.; Hore, P.; *J. Chem. Phys. Lett.* **2001**, *334*, 387.
190. Grodzicki, M.; Flint, H.; Winkler, H.; Walker, F. A.; Trautwein, A. X.; *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4202.
191. Maroie, S.; Savy, M.; Verbist, J. J.; *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 2560.
192. Yamamoto, Y.; Nakashima, T.; Kawano, E.; Chûjô, R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *138*, 349.
193. Jentzen, W.; Simpson, M. C.; Hobbs, J. D.; Song, X.; Ema, T.; Nelson, N. Y.; Medforth, C. J.; Smith, K. M.; Veyrat, M.; Mazzanti, M.; Ramasseul, R.; Marchon, J. C.; Takeuchi, T.; Goddard, W. A.; Shelnut, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11085.
194. Nessel, M. J. M.; Shokhirev, N. V.; Enemark, P. D.; Jacobson, S. E.; Walker, F. A.; *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 5188.
195. Pearson, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
196. Wulfsberg, G.; *Principles of Descriptive Inorganic Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed. Sausalito, University Science Books: California, 1991.
197. Manso, C. M. C. P.; Neri, C. R.; Vidoto, E. A.; Sacco, H. C.; Ciuffi, K. J.; Iwamoto, L. S.; Iamamoto, Y.; Nascimento, O. R.; Serra, O. A.; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 85.
198. Sparks, L. D.; Medforth, C. J.; Park, M. S.; Chamberlain, J. R.; Ondrias, M. R.; Senge, M. O.; Smith, K. M.; Shelnut, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 581.