

Como utilizar a espectroscopia de Mössbauer para desvendar estruturas e segredos catalíticos de enzimas que contêm ferro

ALICE S. PEREIRA e PEDRO TAVARES*

INTRODUÇÃO

O ferro é um dos metais de transição da tabela periódica mais abundantes e disponíveis na Crusta Terrestre, não sendo, por isso, surpreendente a sua vasta incorporação em muitos sistemas biológicos. Existem dois grandes grupos de proteínas que contêm ferro: as proteínas hémicas e as proteínas de ferro não-hémico. Ao primeiro grupo pertencem as proteínas que possuem ferro inserido num anel tetrapirrólico polidentado, tal como as porfirinas. Ao segundo grupo pertencem todas as proteínas de ferro que não se inserem no primeiro, desde as proteínas de ferro-enxofre (1, 2) às proteínas que contêm centros binucleares do tipo μ -oxo (3, 4).

A diversidade funcional dos centros de ferro não-hémico, que vai da manutenção da integridade estrutural à catálise, constitui a força motriz para o empenho dos investigadores no estudo dos mesmos. A compreensão da relação estrutura-função, isto é, da estrutura física do sítio metálico e da estrutura electrónica do metal em função do papel biológico da proteína, é de extrema importância no sentido de compreender o que modela a sua função. Para tal, numerosos métodos físicos e espectroscópicos têm sido aplicados no seu estudo. Recentemente a determinação das estruturas cristalográficas de muitas proteínas tem facilitado a interpretação dos centros metálicos (5, 6). No entanto, muito fica por conhecer sobre o seu comportamento. Uma estrutura cristalográfica dá-nos uma ideia do centro activo num processo estático, nada se podendo estabelecer sobre as alterações sofridas pelo centro durante um processo dinâmico. Esta informação só pode ser obtida pela aplicação de técnicas espectroscópicas. Por exemplo, no estudo de centros metálicos de ferro com função catalítica, é muito provável que alguns dos intermediários envolvam complexos metal-ligando com estados de valência elevada, sobre os quais muito pouco continua a ser conhecido. O uso das

técnicas espectroscópicas possibilita a obtenção de informação sobre o envolvimento destes intermediários de valência elevada na catálise, através da caracterização das propriedades magnéticas do sítio metálico. Como o comportamento magnético de um metal é uma consequência directa da sua estrutura electrónica, a caracterização magnética do centro metálico implica a caracterização da estrutura electrónica do mesmo.

A ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER

A técnica espectroscópica que permite adquirir maior informação sobre proteínas que contenham co-factores de ferro é a espectroscopia de Mössbauer. Para uma revisão à espectroscopia de Mössbauer, o leitor é aconselhado a consultar algumas referências que abordam detalhadamente os fundamentos e aplicações gerais desta técnica (7-11). No âmbito deste artigo serão apenas abordadas algumas noções necessárias à compreensão dos sistemas aqui apresentados.

A espectroscopia de Mössbauer é uma forma de espectroscopia de ressonância nuclear, que utiliza uma fonte de ^{57}Co para gerar a absorção ressonante no núcleo do átomo de ^{57}Fe . O decaimento da fonte de ^{57}Co num estado excitado do núcleo de ^{57}Fe e posterior decaimento deste ao seu estado fundamental, emite uma partícula γ , com a energia de 14.4 keV. Como a energia de absorção dos núcleos de ^{57}Fe nas amostras em estudo depende do ambiente químico em que eles estão inseridos, é necessário fazer variar a energia da radiação monocromática da fonte. Tal é conseguido através do efeito de Doppler. Ao fazer vibrar a fonte, consegue-se fazer variar a energia da radiação e portanto satisfazer a condição de ressonância, observando-se picos de absorção característicos. Dos espectros, assim obtidos, podem-se determinar parâmetros típicos dos centros metálicos nas amostras em estudo. Estes parâmetros (desvio isomérico, desdobramento de quadrupolo,

desdobramento magnético) permitem obter, por exemplo, informação sobre o estado de oxidação e de spin dos átomos de ferro, o número e tipo de ligandos e a quantidade relativa de cada tipo de átomo de ferro e/ou agregados de átomos de ferro. Como exemplo podemos descrever as mudanças observadas no desvio isomérico (δ) de um centro monomérico de ferro. Este é o caso mais simples, pois este tipo de centros apresenta normalmente apenas dois estados de oxidação: férrico e ferroso. Nos sistemas de ferro não-hémico podemos ainda separar os centros monoméricos em dois tipos de coordenação diferente: *i*) tetraédricos e coordenados por enxofres cisteicos (tipo rubredoxina) e *ii*) penta ou hexacoordenados maioritariamente por oxigénios e azotos. Como se pode verificar na figura 1A, a uma diminuição do estado de oxidação e/ou aumento no número de coordenação corresponde um aumento no valor de desvio isomérico. Tal facto implica um aumento na energia necessária para satisfazer a condição de ressonância, que é directamente dependente da densidade dos electrões *d* do átomo de ferro (devido ao efeito de blindagem), da sua esfera de coordenação e da electronegatividade dos ligandos (7). Na figura 1B apresenta-se a correlação entre o desdobramento de quadrupolo e o desvio isomérico para sistemas de spin baixo e de spin alto. Neste artigo serão descritos vários exemplos de sistemas de spin alto. No entanto, sistemas de spin baixo são comuns em proteínas hémicas, tendo sido também observados em proteínas não-hémicas, tais como a hidratase do nitrilo ou as hidrogenases. É possível verificar que a correlação descrita permite identificar o tipo de sistema, bem como o estado de oxidação, dos co-factores de ferro em estudo.

Compreende-se, portanto, que a espectroscopia de Mössbauer seja extensivamente usada na caracterização das proteínas de ferro não-hémico, por permitir determinar o tipo de coordenação e o estado de oxidação dos co-factores presentes nessas pro-

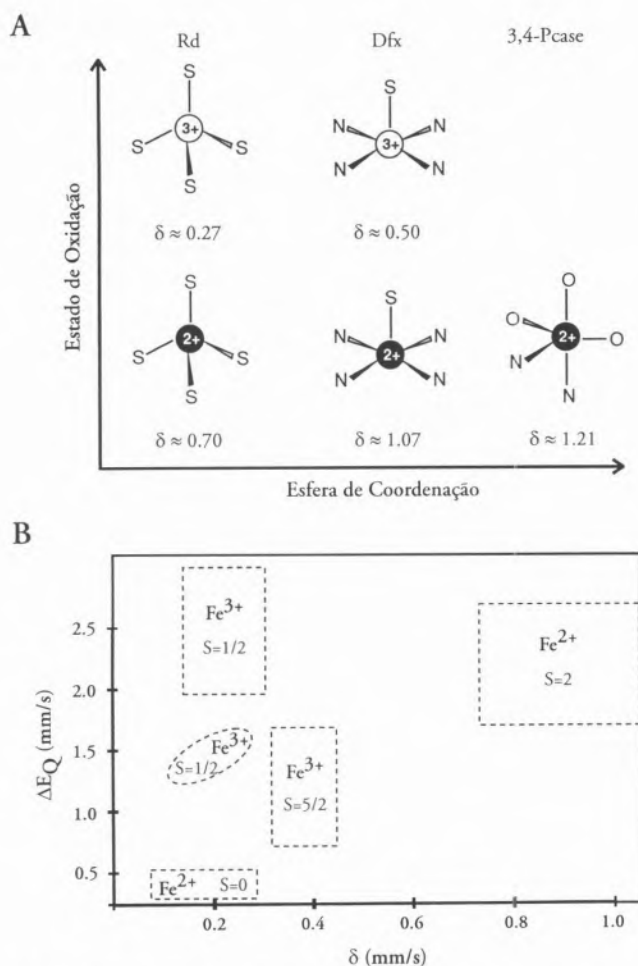


Fig. 1 - Efeito do estado de spin, estado de oxidação e esfera de coordenação dos átomos de ferro nos parâmetros de Mössbauer. Painel A - Variação do desvio isomérico, δ (mm/s), com o estado de oxidação e a esfera de coordenação para um centro de ferro monomérico. Rd - Rubredoxina, Dfx - Desulfoferredoxina, e 3,4-Pcase - 3,4-Protocatequina. Painel B - Correlação entre o desdobramento de quadrupolo e o desvio isomérico para sistemas de spin baixo e de spin alto.

teínas independentemente do seu paramagnetismo.

A principal desvantagem desta técnica advém do facto do isótopo activo de ferro (^{57}Fe) ter uma abundância natural de apenas 2,2% e de serem necessárias concentrações deste na ordem dos milimolar para que se obtenham dados de boa qualidade. Para colmatar este problema têm sido desenvolvidos processos de enriquecimento em ^{57}Fe , que passam pela adição controlada do mesmo ao meio de crescimento bacteriano. Para proteínas cuja origem não seja bacteriana, é usual recorrer às técnicas de biologia molecular disponíveis para se obter sobre-expres-

são dos genes que codificam para as proteínas de interesse em bactérias (normalmente *Escherichia (E.) coli*). Em conjugação com cuidadosas técnicas de purificação e isolamento de proteínas é possível obter o material biológico necessário à realização de experiências tais como as que se descrevem neste artigo.

À DESCOBERTA DE NOVOS CO-FACTORES

Em 1992 foi publicado o isolamento a partir de extractos celulares de *Desulfovibrio (D.) desulfuricans* ATCC 27774 (uma estirpe bacteriana capaz

de reduzir sulfato ou nitrato) de uma nova proteína, de função desconhecida, que continha centros de ferro com características espectroscópicas peculiares (12). Esta proteína, mais tarde denominada fuscoredoxina (com base na sua cor acastanhada e nas capacidades de transferência electrónica), foi alvo de estudos espectroscópicos pormenorizados e a estrutura cristalográfica dos seus centros foi elucidada recentemente (13). Proteínas homólogas foram já identificadas em diferentes estirpes bacterianas, tais como *Thiobacillus ferrooxidans*, *Morganella morganii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (DeltaH) e *E. coli*. (14-17). De entre estas, a fuscoredoxina de *E. coli* foi já clonada, sobre-expressa e caracterizada bioquímica e espectroscopicamente (18).

A espectroscopia de Mössbauer facilmente identificou a presença de dois tipos diferentes de centros (19). Observou-se que o centro 1, diamagnético na amostra nativa (i.e. resultante do processo de purificação) contribuía 50% para a absorção total e apresentava parâmetros típicos de um centro do tipo $[4Fe-4S]$ no estado 2+. A segunda componente espectral, representando 50% da absorção total, foi atribuída ao centro 2, tendo sido possível constatar a sua interconversão em diferentes estados de oxidação.

Através da desconvolução dos espectros de Mössbauer de várias amostras preparadas por adição de agentes oxidantes ou redutores fracos à amostra nativa, foi possível verificar que, nestas condições, o centro 1 não era activo do ponto de vista de oxidação-redução e que o centro 2 poderia existir em três estados de oxidação diferentes, dependentes do potencial de oxidação-redução. No estado totalmente oxidado o centro 2 possui quatro átomos de ferro no estado férrico de spin alto ($S=5/2$), cujo acoplamento de spin dá origem a um centro diamagnético. A redução mono-electrónica do centro produz um estado paramagnético extremamente invulgar. Com efeito, um dos quatro ferros está agora no estado ferroso de spin

alto ($S=2$) e do espectro de Mössbauer é possível deduzir que o spin se encontra localizado. A figura 2 demonstra como é possível chegar a esta conclusão. O centro encontra-se agora num estado paramagnético com $S=9/2$, designado estado "1e-reduzido". No espectro de Mössbauer, adquirido a campo baixo, identificam-se quatro componentes de igual intensidade (um por cada ferro do centro) mas com diferentes valores de desvio isomérico, desdobramento de quadrupolo e desdobramento magnético. Com base nestes parâmetros é possível atribuir um tipo de coordenação, bem como um estado de oxidação, a cada ferro constituinte do centro. Pode-se agora correlacionar estes dados com a estrutura terciária obtida por cristalografia de Raios-X (13). Neste estudo os átomos de ferro do centro 2 foram designados por Fe₅, Fe₆, Fe₇ e Fe₈. De acordo com os parâmetros obtidos conclui-se que Fe₈ sofreu redução, enquanto que os restantes três ferros permaneceram no estado férrico. As constantes de acoplamento hiperfino observadas revelam que o sistema é bem descrito pelo seguinte esquema de acoplamento (ver figura 2). Os spins de Fe₈ ($S_1=2$) e Fe₆ ($S_2=5/2$) são paralelos e acoplados para formar um spin intermediário, S_A , igual a 9/2. Por sua vez S_A está antiferromagneticamente acoplado ao spin de Fe₅ ($S_3=5/2$) para originar outro spin intermediário, $S_B=2$. Finalmente, S_B encontra-se ferromagneticamente acoplado ao spin de Fe₇ ($S_4=5/2$), resultando num spin final igual a 9/2.

O que acontece se efectuarmos nova redução da amostra anterior? Amostras produzidas com um estado de oxidação mais baixo revelam que nestas circunstâncias ocorre a redução de Fe₇, obtendo-se um centro com igual número de iões ferrosos e férricos (designado por "2e-reduzido") com um spin total $S=4$. Este estado pode agora ser explicado por um esquema de acoplamento semelhante ao anteriormente descrito mas em que $S_4=2$.

Em amostras proteicas ainda mais reduzidas é possível identificar

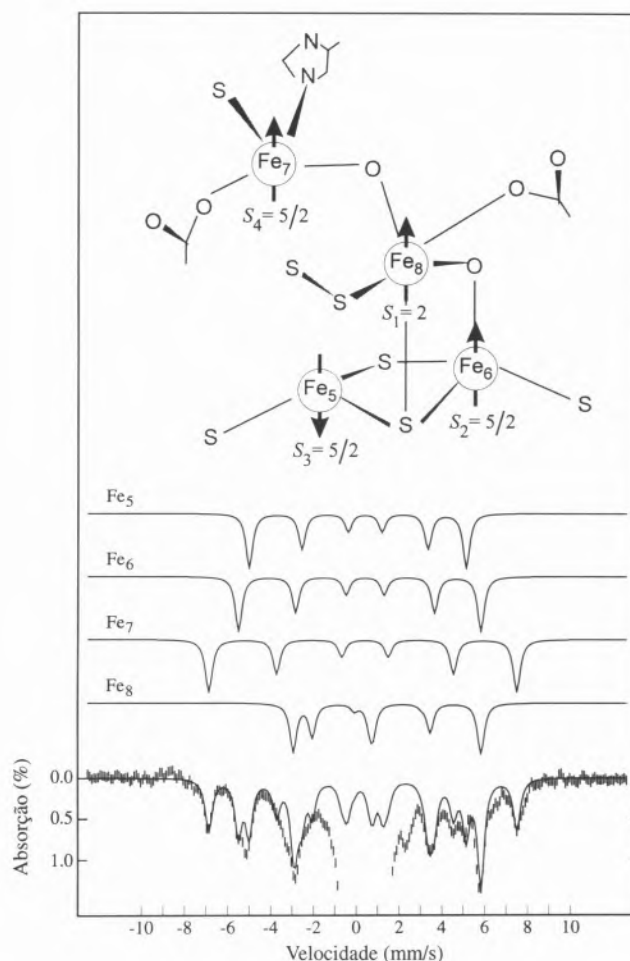


Fig. 2 - Espectro de Mössbauer da fuscoredoxina evidenciando a contribuição do centro 2 no estado "1e-reduzido", cuja representação esquemática é apresentada na parte superior da figura. O espectro foi adquirido na presença de um campo magnético baixo e a baixa temperatura (4.2 K, 0.5 mT). A linha sobreposta ao espectro experimental representa a soma das contribuições individuais dos diferentes átomos de ferro.

a presença de mais um ferro no estado ferroso (Fe₆). No entanto, para estes valores de potencial de oxidação-redução ocorre a transferência de um electrão para o centro 1, que passa ao estado [4Fe-4S]¹⁺, tornando-se paramagnético e dificultando a análise espectral.

Também no caso da ferroquelatase, enzima que catalisa o último passo da biossíntese do grupo hémico, foi através da espectroscopia de Mössbauer que se identificou a presença de um centro de [2Fe-2S] como parte integrante desta enzima (20). Menos recente, mas não menos importante, foi a descoberta do cen-

tro de [3Fe-4S] em sistemas biológicos (21-23). Neste caso a espectroscopia de Mössbauer permitiu esclarecer a identidade dos co-factores da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* e da aconitase, enzima essencial ao ciclo de Krebs.

Estamos assim na presença de uma técnica que pode sondar todas as propriedades estruturais e magnéticas dos co-factores de ferro. Mas como obter a evolução destas propriedades com o tempo, isto é, num processo dinâmico? Como veremos, a resposta é a utilização de técnicas de congelamento rápido ("Rapid Rapid-Freeze Quench", RFQ).

TÉCNICAS DE CONGELAMENTO RÁPIDO OU "RAPID-FREEZE QUENCH"

A combinação da espectroscopia de Mössbauer com técnicas de congelamento rápida tem possibilitado a identificação/caracterização de vários intermediários catalíticos (24-30). Se quisermos estudar o percurso de uma reacção vamos necessariamente ter que preparar amostras com diferentes tempos de reacção. Devido à velocidade das reacções enzimáticas, a escala de tempo terá de ser da ordem dos milissegundos. A figura 3 esquematiza o dispositivo experimental utilizado neste tipo de experiências. As soluções de enzima e substrato são mantidas em seringas separadas. Um computador controla um mecanismo de direcção que impele (simultaneamente e a velocidade constante) o êmbolo das seringas, projectando o líquido nelas contido através de uma câmara de mistura. Na saída da câmara de mistura existe um tubo de envelhecimento, cujo comprimento determina o tempo de reacção. Após atravessar o tubo de envelhecimento

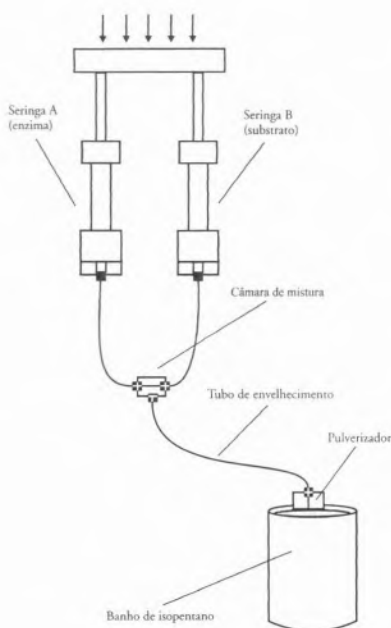


Fig. 3 - Montagem para "Rapid-Freeze Quench".

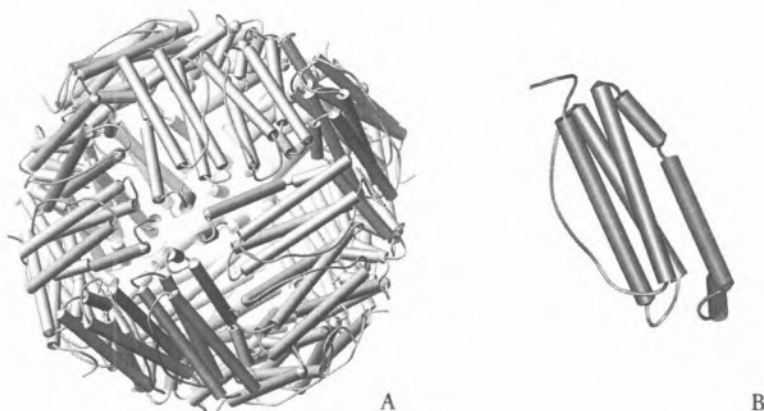


Fig. 4 - Estrutura cristalográfica da Ferritina. Molécula de ferritina esférica (A), constituída por 24 subunidades do tipo M. Em cada monómero (B) existe um local único onde ocorre oxidação dos iões ferrosos com a concomitante formação do centro binuclear.

a mistura é pulverizada num banho de isopentano arrefecido a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, sofrendo congelamento imediata. A "neve proteica" assim gerada é depois empacotada em células apropriadas à análise espectroscópica a utilizar. Para tubos de envelhecimento suficientemente pequenos é possível obter tempos de residência de aproximadamente 20 ms.

A primeira publicação que descreve a aplicação desta técnica à espectroscopia de Mössbauer data de 1994. Desde então, e com o concomitante desenvolvimento de metodologias de análise dos dados adquiridos, foi possível decodificar interessantes mecanismos catalíticos tais como os exemplos que de seguida se apresentam.

UM EXEMPLO DE BIOMINERALIZAÇÃO

O ferro é normalmente utilizado pelos seres vivos no estado de oxidação $2+$. No entanto, neste estado de oxidação e dependendo da sua concentração pode ser nocivo, afectando o bom funcionamento da maquinaria celular. Por oxidação pode gerar peróxido de hidrogénio, superóxido e outras espécies reactivas de oxigénio. Por outro lado, ao pH fisiológico, a solubilidade do ião férrico é muito baixa. Com efeito a concen-

tração de ferro utilizado é cerca de 100 biliões de vezes superior à solubilidade do ião livre. Assim existe a necessidade de um sistema biológico que permita a concentração e armazenamento do ferro. A ferritina é a proteína responsável por este processo, sendo a única que catalisa uma transição de fase reversível entre os iões em solução e numa matriz sólida (31-33). A estrutura da ferritina é comum em todos os organismos conhecidos (animais, plantas e microrganismos). Constituída por 24 subunidades, cada uma organizada num feixe de quatro hélices ("four helix bundle"), possuindo a forma global de uma coroa esférica com cerca de 12 nm de diâmetro (ver figura 4). Durante a mineralização, o ião ferroso é inicialmente oxidado em canais que atravessam a coroa esférica e posteriormente depositado na cavidade central sob a forma de mineral ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). A cavidade central, cujo diâmetro é de cerca de 8 nm, pode acumular até 4500 átomos de Fe. A velocidade de oxidação e mineralização depende do tipo de subunidade presente em proteínas. Presentemente estão caracterizados três tipos de subunidades (L, H e M), cuja expressão depende do tecido celular. Estudos efectuados com proteínas recombinantes constituídas somente por um dos tipos de subunidade provaram que as subunidades

H e M apresentam uma taxa de oxidação do ião ferroso aproximadamente 100 vezes superior à subunidade L. Assim se quisermos estudar as fases iniciais desta catálise as subunidades H e M parecem ser as melhores candidatas.

Num conjunto de experiências (27) fez-se reagir a proteína recombinante constituída por subunidades do tipo H com oxigénio, produzindo-se amostras com tempo reaccionais entre 10 ms e 1 s. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 5 e 6. Foi pela primeira vez possível obter uma medição directa do substrato consumido (Fe^{2+}) ao longo do tempo, pois nos dados adquiridos com a aplicação de um campo magnético externo de baixa magnitude (figura 5) é possível quantificar com grande rigor a linha de mais alta

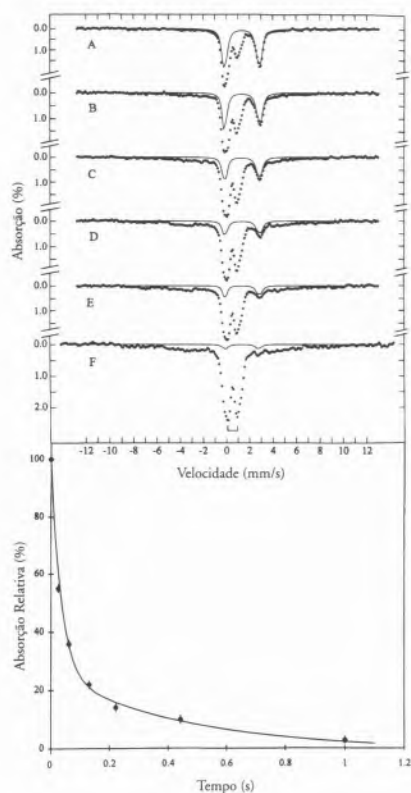


Fig. 5 - Espectros de Mössbauer (4.2 K, 0.5 mT) da ferritina H reagida com 36 átomos de Fe^{2+} por molécula, na presença de concentrações saturantes de O_2 . A - 20 ms, B - 60 ms, C - 130 ms, D - 220 ms, E - 440 ms, e F - 1 s. Pannel inferior: oxidação do ião ferroso.

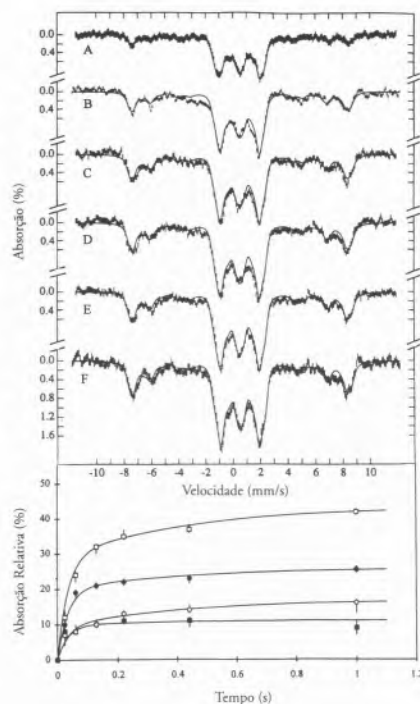


Fig. 6 - Espectros de Mössbauer (4.2 K, 8 T) da ferritina H reagida nas condições descritas na figura 5. No pannel inferior é apresentada a evolução das espécies férricas formadas ao longo do tempo reaccional. Espécie trimérica (quadrados vazios) e diméricas (restantes curvas).

energia do duplo de quadrupolo atribuído ao substrato. Nestas condições é visível um aumento na quantidade de espécies de desvio isomérico mais baixo, ou seja férricas. Estas espécies são diamagnéticas ($S=0$) pois provêm do acoplamento antiferromagnético de dois ferros férricos. Como tal, nestas condições experimentais torna-se muito difícil efectuar uma quantificação rigorosa. Assim, é necessário adquirir os espectros de Mössbauer na presença de um campo magnético aplicado de magnitude significativa (1 a 8 T). Na figura 6 são apresentados dados adquiridos com a aplicação de um campo magnético de 8 T, aos quais foi subtraída a contribuição do ferro substrato (Fe^{2+}). Devido à maior resolução destes espectros é agora possível identificar diferentes dímeros e uma espécie trimérica, em que cada átomo de Fe possui uma esfera de coordenação constituída por O e/ou N. Da evolução temporal de todas

estas espécies podemos concluir que, na ferritina do tipo H, o ferro substrato é maioritariamente consumido com uma constante cinética de pseudo-primeira ordem, k_1 , igual a $28.5 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, originando de forma paralela três tipos de formas diméricas e uma trimérica.

E o que acontece na ferritina do tipo M? Com um conjunto de experiências semelhantes às descritas anteriormente (28), foi detectado um novo tipo de intermediário na etapa inicial da oxidação. Como é possível observar na figura 7, o consumo do substrato é agora mais rápido (k_1 aproximadamente igual a 80 s^{-1}) gerando apenas um intermediário férrico. Este intermediário, que possui parâmetros típicos de um complexo peroxo-diférrico, posteriormente decai em algumas das espécies diméricas já observadas na ferritina H.

Podemos portanto sugerir uma interpretação mecanística para a etapa de oxidação do ferro catalisada pela ferritina (ver figura 8). Num primeiro passo a apoferritina tem a capacidade de coordenar o ferro ferroso existente em solução numa estequiometria de dois ferros por sítio de coordenação (formando um centro binuclear). Seguidamente ocorre a oxidação com formação de um intermediário do tipo peroxo. Tal facto implica necessariamente a existência de um sítio único de ligação do ferro ferroso. Devido à natureza da catálise em causa, este sítio dá então origem a espécies diméricas múltiplas, que num passo final são depositadas na cavidade central. O facto de não ter sido observado o intermediário do tipo peroxo no caso da ferritina H pode ser explicado se tivermos em conta a velocidade de formação e decaimento deste intermediário. Para que um intermediário seja detectável é necessário que a diferença destas duas velocidades seja tal que permita a acumulação de quantidades iguais ou superiores a 5% do ferro total presente na amostra. Assim, e apesar do caminho catalítico poder ser igual para as duas ferritinas, no caso da ferritina H a velocidade de formação do intermediário do tipo peroxo é

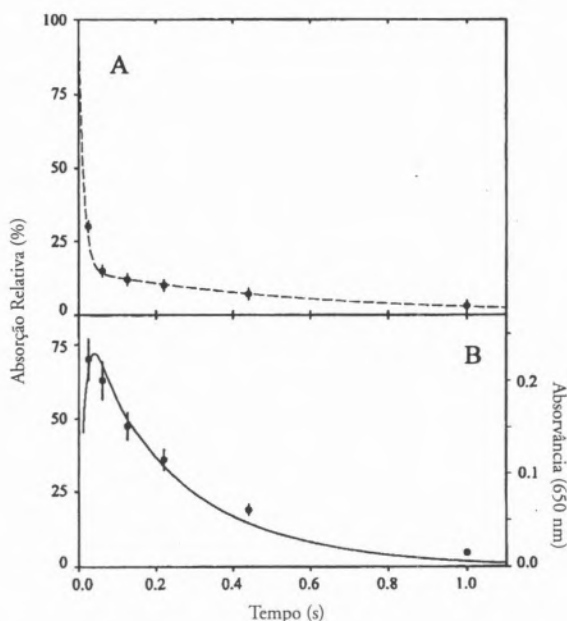


Fig. 7 - Resultados obtidos para a experiência de RFQ-Mössbauer com a ferritina M, nas condições descritas para a ferritina H (figura 5). A - oxidação do íon ferroso, B - formação e decaimento do intermediário peroxo-diférrico detectado através das espectroscopias de Mössbauer e visível.

demasiado lenta e/ou o seu decaimento demasiado rápido para que se torne detectável.

Uma dúvida subsiste neste mecanismo. Qual a espécie que se forma por decaimento do intermediário tipo peroxo? Duas possibilidades existem. Numa delas, o decaimento origina as espécies diférricas com a formação de peróxido de hidrogénio. Uma segunda hipótese contempla a existência de um intermediário diférrico (centro binuclear de ferro com ambos os átomos de ferro no estado +4). Este intermediário, já detectado em outras enzimas contendo centros binucleares do tipo μ -oxo, seria formado por homólise da forma peroxo e poderia reagir com uma ou mais moléculas de água originando peróxido de hidrogénio e as múltiplas formas das espécies diférricas observadas.

A COMPARAÇÃO DE MECANISMOS E INTERMEDIÁRIOS

Até que ponto é que existe um mecanismo geral para enzimas que contenham no seu centro activo um

centro binuclear do tipo μ -oxo e cujo mecanismo de acção envolva a activação da molécula de O_2 ? De momento apenas três destas enzimas foram extensivamente estudadas por técnicas de cinética rápida acopladas à espectroscopia de Mössbauer: a ferritina, descrita no exemplo anterior, a reductase de ribonucleotídeos pertencente à classe I, RNR (34), e a monooxigenase do metano, MMO (35).

Como o nome indica, a RNR catalisa a redução de ribonucleotídeos a deoxiribonucleotídeos, sendo esta reacção a primeira da via biossintética do ADN. A proteína de *E. coli*, que pertence à classe I, é constituída por duas subunidades homodiméricas designadas por R1 e R2. A subunidade R1 é um homodímero de 86 kDa que contém o local de ligação do substrato e o resíduo de cisteína envolvido na catálise. A subunidade R2 é um homodímero de 43 kDa que contém um radical tirosilo estável (Y122*), necessário à actividade enzimática. Contém ainda um centro binuclear de ferro do tipo μ -oxo localizado na proximidade do radical tirosilo. Só a forma activa da enzima contém o radical tirosilo, que é gera-

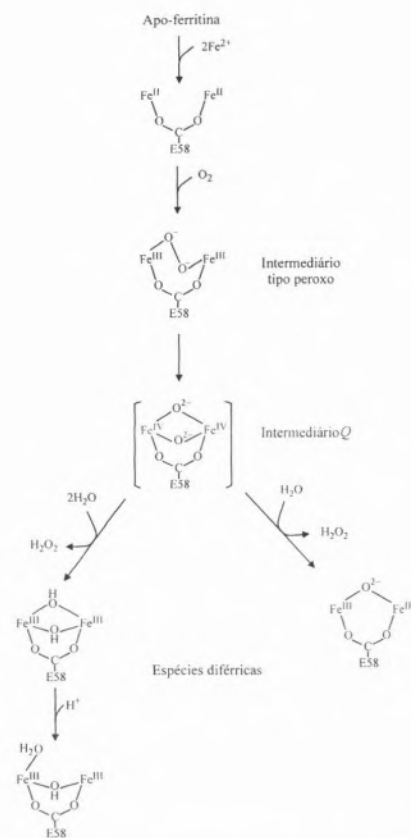
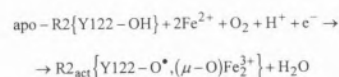


Fig. 8 - Mecanismo proposto para a etapa inicial da oxidação do ferro catalisada pela ferritina.

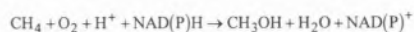
do por reconstituição do centro binuclear de acordo com a seguinte reacção:



A redução do oxigénio molecular da água requer quatro electrões, três dos quais são obtidos via a oxidação dos 2 equivalentes de íons ferrosos a férricos e pela oxidação do resíduo de cisteína a radical tirosilo. A fonte do quarto electrão é controversa, mas *in vitro* pode ser doado por excesso de Fe^{2+} ou ascorbato usado na reconstituição da apoproteína. Durante a reconstituição vários intermediários são formados (ver figura 9). Foi recentemente demonstrado que o primeiro intermediário desta reacção é um complexo peroxo-diférrico, que posteriormente

decai num intermediário um equivalente mais oxidado, que pode formalmente ser representado por $\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{4+}$. Este intermediário, denominado X, é então cataliticamente competente para oxidar o resíduo de cisteína a radical tirosilo com a concomitante redução a um complexo diférrico.

A MMO é um sistema enzimático isolado de bactérias metanotróficas, que catalisa o primeiro passo da sua via metabólica transformando metano em metanol:



A forma solúvel deste sistema é constituída por três diferentes proteínas: uma redutase (MMOR) que contém um centro $[\text{2Fe-2S}]$ e um grupo flavínico, uma proteína que não contém qualquer cofactor (MMOB) e a hidroxilase que contém um centro binuclear do tipo μ -oxo (MMOH). Constituída por três tipos de subunidades diferentes, $(\alpha\beta\gamma)_2$, a hidroxilase apresenta uma massa molecular de aproximadamente 250 kDa. O centro binuclear encontra-se localizado na subunidade α e é o sítio onde ocorre a hidroxilação do metano. O ciclo catalítico é iniciado pela redução do centro binuclear de Fe, mediada pela MMOR. Na ausência do substrato metano, o centro diférrico reage com o oxigénio molecular para formar o primeiro intermediário. Tal como nos exemplos anteriores este intermediário é um complexo peroxo-diférrico denominado H_{peroxo} (ver figura 9). No entanto, contrariamente a esses exemplos, a espécie H_{peroxo} decai no intermediário Q cujos parâmetros de Mössbauer sugerem ser um complexo diférrico. Foi sugerido que este intermediário, devido ao seu elevado poder oxidante, é cataliticamente competente para realizar a oxidação dielectrónica do substrato reduzindo-se ao estado diférrico.

Deste modo, qualquer dos mecanismos descritos envolvem um intermediário inicial comum (complexo peroxo-diférrico) mas aparentemente diferem no segundo interme-

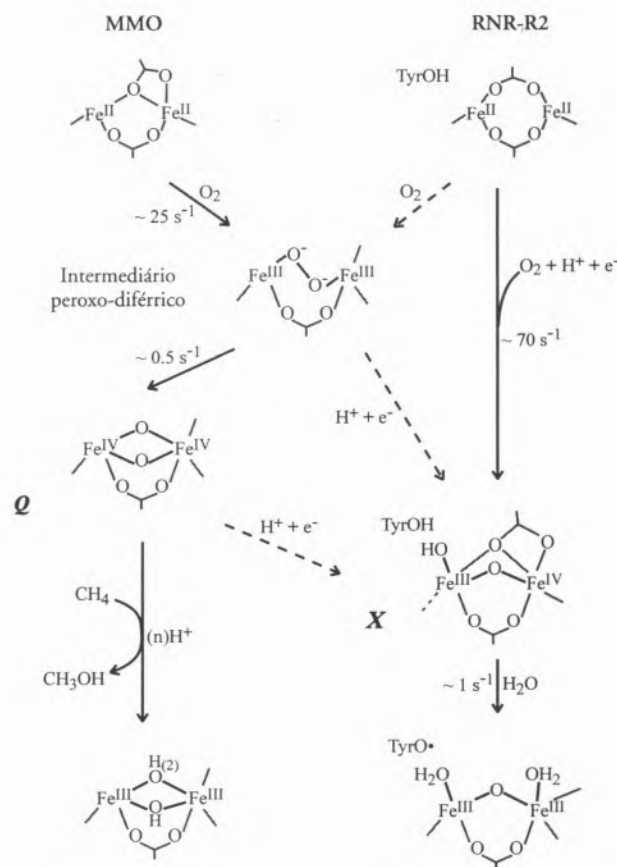


Fig. 9 - Comparação dos mecanismos catalíticos de activação da molécula de oxigénio por centros binucleares de ferro do tipo μ -oxo da MMO (via intermediário Q) e da RNR-R2 (via intermediário X).

diário do ciclo catalítico. Sabemos que o intermediário Q está num estado de oxidação formal superior ao intermediário X, mas até que ponto existe uma diferença estrutural entre estes intermediários? Será que podemos utilizar a espectroscopia de Mössbauer para comparar os ciclos catalíticos mesmo quando os intermediários diferem no seu estado de oxidação? O problema principal advém do facto do intermediário Q não possuir estrutura magnética devido ao acoplamento antiferromagnético existente entre os dois Fe^{4+} constituintes do centro (resultando num spin total nulo). Este problema foi solucionado com o auxílio da técnica de redução radiolítica (30). Preparou-se uma amostra de RFQ ao tempo reaccional ao qual correspondia a concentração máxima do intermediário Q (6 s) e adquiriu-se o es-

pectro de Mössbauer em condições óptimas. De seguida sujeitou-se a amostra congelada a uma irradiação com raios γ de alta energia. Após a irradiação foram novamente adquiridos espectros de Mössbauer. Verificou-se que a irradiação produziu a redução mono-electrónica do intermediário Q presente na amostra, criando uma espécie paramagnética, QX, em que um dos ferros do centro binuclear se encontra no estado de oxidação $3+$ e o outro continua no estado $4+$. Estamos na presença de um sistema isotrópico com $S=1/2$, no qual o espectro de Mössbauer adquirido na presença de um campo magnético fraco é fortemente dependente da direcção desse mesmo campo (ver referência 9). Nestes casos as linhas correspondentes à transição $\Delta m=0$ têm intensidades mínimas e máximas quando o campo magnéti-

co é aplicado, respectivamente, paralelamente ou perpendicularmente à radiação. Como, à excepção de QX, todas as espécies presentes na amostra são diamagnéticas ou de spin inteiro não apresentando dependência do campo magnético aplicado, por diferença dos espectros obtidos no modo paralelo e perpendicular é possível determinar as características espectrais de QX. A figura 10 mostra a análise dos dados obtidos. Esta análise revela que os intermediários QX e X possuem parâmetros semelhantes, tendo sido possível estabelecer, pela primeira vez, um paralelismo entre os mecanismos catalíticos das duas enzimas (RNR e MMO).

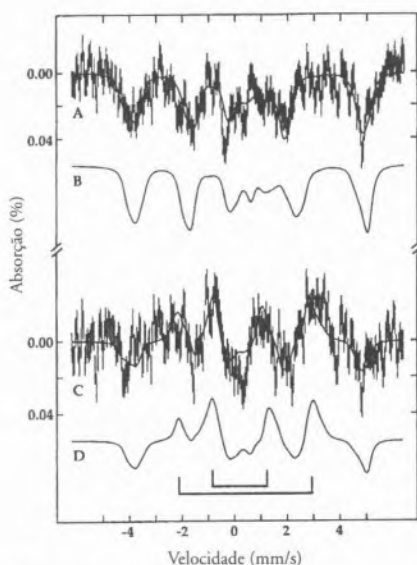


Fig. 10 - Mössbauer do intermediário QX. A - espectro adquirido a 4.2 K e 0.5 mT aplicado perpendicularmente à radiação γ . C - espectro diferença entre o modo paralelo e perpendicular. B e D correspondem a simulações obtidas para o intermediário X da RNR-R2.

COMENTÁRIOS FINAIS

Embora limitada a sistemas que contenham co-factores com ferro, a espectroscopia de Mössbauer provou ser uma ferramenta valiosa no estudo de sistemas biológicos. Por si só permitiu a identificação inequívoca de vários novos tipos de centros de ferro. Por se poder estabelecer uma forte correlação com a espectroscopia

de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) permitiu identificar novos sistemas de spin, mas também resolver ambiguidades que, estamos certos, de outra forma seriam ainda hoje fruto de discussões.

O desenvolvimento das técnicas de RFQ permitiu adicionar mais uma dimensão, o tempo reaccional, às análises de Mössbauer. De uma visão estática dos sistemas, em que normalmente apenas se estudava a mudança de estados de oxidação-redução ou a ligação de substratos/inibidores, passou-se a uma visão dinâmica que permite caracterizar intermediários catalíticos. Também neste caso é possível conjugar diferentes técnicas espectroscópicas. É possível obter amostras de RFQ que podem ser analisadas pela aplicação da espectroscopia de Mössbauer mas também de RPE, EXAFS e Ressonância de Raman. No entanto, devido às capacidades únicas de caracterização e quantificação dos centros de ferro a espectroscopia de Mössbauer será sempre uma peça central neste tipo de estudos.

A integração das informações obtidas pelas metodologias descritas com as estruturas determinadas por cristalografia de raios-X é também fundamental. Cada vez mais são determinadas as estruturas tridimensionais de metaloproteínas. Podemos assim conhecer os detalhes estruturais dos centros activos e estabelecer uma visão global dos mecanismos enzimáticos.

É nossa opinião que o início do novo milénio se afigura promissor nesta área científica, pelo que esperamos ter feito uma introdução cativante das potencialidades da espectroscopia de Mössbauer e das técnicas que a ela podem ser associadas.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos Professores José J. G. Moura, Isabel Moura e Boi H. Huynh os ensinamentos e o entusiasmo que nos transmitiram no campo das metaloproteínas e das espectroscopias de

RPE e Mössbauer. Ainda ao Professor Boi H. Huynh e ao Professor Dale E. Edmonson pelos excelentes momentos passados a aprender a técnica de "Rapid-Freeze Quench", em particular aplicada à espectroscopia de Mössbauer, da qual são ilustres pioneiros. Finalmente a todos os nossos colegas, dos diferentes grupos de investigação de que fizemos parte, pelo companheirismo e ajuda que sempre nos prestaram.

* Departamento de Química e Centro de Química Fina e Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2825-114 Caparica, Portugal.

REFERÊNCIAS

1. Moura, I., Pereira, A. S., Tavares, P., and Moura, J. J. G., Simple and complex iron-sulfur proteins in sulfate reducing bacteria, *Adv. Inorg. Chem.*, **47**, 361 (1999).
2. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E., Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science (Washington, D. C.)*, **277**, 653 (1997).
3. Lange, S. J., and Que, L., Oxygen activating nonheme iron enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 159 (1998).
4. Nordlund, P., and Eklund, H., Di-iron-carboxylate proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 758 (1995).
5. Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., and Frey, M., Novel metal sites in protein structures, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 804 (1996).
6. Peters, J. W., Structure and mechanism of iron-only hydrogenases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 670 (1999).
7. Waerenborgh, J. C., Espectroscopia de Mössbauer, *Bol. Soc. Port. Quím.*, **74**, 22 (1999).
8. Huynh, B. H., Mössbauer spectroscopy in study of cytochrome *cd1* from *Thiobacillus denitrificans*, desulfovinidin, and iron hydrogenase, *Methods Enzymol.*, **243**, 523 (1994).
9. Moura, I., Aplicações Biológicas da Espectroscopia de Mössbauer, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*, **51**, 19 (1995).
10. Huynh, B. H., and Kent, T. A., Mössbauer studies of biomolecules, *Stud. Phys. Theor. Chem.*, **25**, 490 (1983).
11. Huynh, B. H., and Kent, T. A., Mössbauer studies of iron proteins, *Adv. Inorg. Biochem.*, **6**, 163 (1984).
12. Moura, I., Tavares, P., Moura, J. J. G., Ravi, N., Huynh Boi, H., Liu, M. Y., and LeGall, J., Direct spectroscopic evidence for the presence of a 6-iron cluster in an iron-sulfur protein isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774), *J. Biol. Chem.*, **267**, 4489 (1992).
13. Arendsen, A. F., Hadden, J., Card, G., McAlpine, A. S., Bailey, S., Zaitsev, V., Duke, E. H. M., Lindley, P. F., Krockel, M., Trautwein, A. X., Feiters, M. C., Charnock, J. M., Garner, C. D., Marriott, S. J., Thomson, A. J., Kooter, I. M., Johnson, M. K., Van Den Berg, W. A. M., Van Dongen, W. M. A. M., and Hagen, W. R., The "prismant" protein resolved: x-ray structure at 1.7 Å and multiple spectroscopy of two novel 4Fe clusters, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 81 (1998).

14. Dominy, C. N., Deane, S.M., and Rawlings, D.E., A geographically widespread plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans* has genes for ferredoxin-, FNR-, prismane- and NADH-oxidoreductase-like proteins which are also located on the chromosome, *Microbiology*, **143** (Pt 10), 3123 (1997).
15. Kühn, S., Braun, V., and Köster, W., *J. Bacteriol.*, **178**, 496 (1996).
16. Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghegan, N. S. M., and Venter, J. C., Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, *Science*, **273**, 1058 (1996).
17. Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., and Reeve, J. N., Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics, *Journal of Bacteriology*, **179**, 7135 (1997).
18. Pereira, A. S., Tavares, P., Krebs, C., Huynh, B. H., Rusnak, F., Moura, I., and Moura, J. J. G., Biochemical and Spectroscopic Characterization of Overexpressed Ferredoxin from *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 209 (1999).
19. Tavares, P., Pereira, A. S., Krebs, C., Ravi, N., Moura, J. J. G., Moura, I., and Huynh, B. H., Spectroscopic Characterization of a Novel Tetranuclear Fe Cluster in an Iron-Sulfur Protein Isolated from *Desulfovibrio desulfuricans*, *Biochemistry*, **37**, 2830 (1998).
20. Ferreira, G. C., Franco, R., Lloyd, S. G., Pereira, A. S., Moura, I., Moura, J. J. G., and Huynh, B. H., Mammalian ferredoxin, a new addition to the metalloenzyme family, *J. Biol. Chem.*, **269**, 7062 (1994).
21. Kent, T. A., Huynh, B. H., and Munck, E., Iron-sulfur proteins: Spin-coupling model for three-iron clusters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 6574 (1980).
22. Hanh, H. B., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Munck, E., Evidence for a three-iron center in a ferredoxin from *Desulfovibrio gigas*. Mössbauer and EPR studies, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3242 (1980).
23. Kent, T. A., Dreyer, J. L., Emptage, M. H., Moura, I., Moura, J. J. G., Huynh, B. H., Xavier, A. V., LeGall, J., and Beinert, H., Evidence for a novel three-iron center in two ferredoxins and aconitase, in *Electron Transp. Oxygen Util., [Int. Symp. Interact. Iron Proteins Oxygen Electron Transp.]*, Ho, C., Ed., Elsevier, New York, N. Y., pp. 371 (1982).
24. Bollinger, J. M., Jr., Stubbe, J., Huynh, B. H., and Edmondson, D. E., Novel Diferric Radical Intermediate Responsible for Tyrosyl Radical Formation in Assembly of the Cofactor of Ribonucleotide Reductase, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6289 (1991).
25. Bollinger, J. M., Jr., Edmondson, D. E., Huynh, B. H., Filley, J., Norton, J. R., and Stubbe, J., Mechanism of Assembly of the Tyrosyl Radical-Dinuclear Iron Cluster Cofactor of Ribonucleotide Reductase, *Science*, **253**, 292 (1991).
26. Coufal, D. E., Tavares, P., Pereira, A. S., Huynh, B. H., and Lippard, S. J., Reactions of Nitric Oxide with the Reduced Non-Heme Diiron Center of the Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase, *Biochemistry*, **38**, 4504 (1999).
27. Pereira, A. S., Tavares, P., Lloyd, S. G., Danger, D., Edmondson, D. E., Theil, E. C., and Huynh, B. H., Rapid and parallel formation of Fe₃⁺ multimers, including a trimer, during H-type subunit ferritin mineralization, *Biochemistry*, **36**, 7917 (1997).
28. Pereira, A. S., Small, W., Krebs, C., Tavares, P., Edmondson, D. E., Theil, E. C., and Huynh, B. H., Direct spectroscopic and kinetic evidence for the involvement of a peroxodiferric intermediate during the ferroxidase reaction in fast ferritin mineralization, *Biochemistry*, **37**, 9871 (1998).
29. Tavares, P., Pereira, A. S., Lloyd, S. G., Danger, D., Edmondson, D. E., Theil, E. C., and Huynh, B. H., Mössbauer spectroscopic and kinetic characterization of ferric clusters formed in H-chain ferritin mineralization, *Book of Abstracts, 213th ACS National Meeting, San Francisco, April 13-17, INOR* (1997).
30. Valentine, A. M., Tavares, P., Pereira, A. S., Davydov, R., Krebs, C., Hoffman, B. M., Edmondson, D. E., Huynh, B. H., and Lippard, S. J., Characterization of a Mixed-Valent Fe(III)Fe(IV) Form of Intermediate Q in the Reaction Cycle of Soluble Methane Monooxygenase, an Analog of Intermediate X in Ribonucleotide Reductase R2 Assembly, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2190 (1998).
31. Theil, E. C., and Huynh, B. H., Ferritin mineralization: ferroxidation and beyond, *J. Inorg. Biochem.*, **67**, 30 (1997).
32. Theil, E. C., and Sayers, D. E., Ferritin iron cores: variable iron biomimetics, in *Iron Biomimetics, [Proc. Conf.]*, Frankel, R. B., Ed., Plenum, New York, N. Y., pp. 295 (1991).
33. Harrison, P. M., and Arosio, P., The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 161 (1996).
34. Jordan, A., and Reichard, P., Ribonucleotide reductases, *Annu Rev Biochem*, **67**, 71 (1998).
35. Lipscomb, J. D., Lee, S.-K., Nesheim, J. C., Jin, Y., Wallar, B. J., and Zhang, X.-Y., Intermediates in the reaction cycle of methane monooxygenase: structure and chemistry, in *Iron Metabolism*, Ferreira, G. C., Moura, J. J. G., and Franco, R., Eds., Wiley-VCH, pp. 323 (1999).

Instituto Português da Qualidade

Ministério da Indústria e Energia

PORTUGUESE INSTITUTE FOR QUALITY

Rua C e Avenida dos Três Vales
2825 MONTES DA CAPARICA
Portugal
Tel: (011) 294 81 00
Fax: (011) 294 81 01

CERTIFICADO DE CONFORMIDADE

NUMERO

96/CEP.410

O INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE certifica que o Sistema da Qualidade da

SOQUÍMICA - SOCIEDADE DE REPRESENTAÇÕES DE QUÍMICA, LDA.

Rua Coronel Santos Pedroso, 15
1500 LISBOA
PORTUGAL

implantado na comercialização, manutenção e calibração de equipamentos de laboratório, cumpre os requisitos da Norma Portuguesa NP EN ISO 9002 - "Sistemas da Qualidade. Modelo de garantia da qualidade na produção, instalação e assistência após venda".

O presente certificado é emitido ao abrigo do Decreto-Lei n.º 234/93 de 2 de Julho, e de acordo com a Directiva CNQ 22 - "Certificação de sistemas da qualidade de empresas. Metodologias e regras gerais".

A presente certificação é válida por um período de três anos, renovável.

Monte de Caparica, 18 de Junho de 1996

Cândido dos Santos

Cândido dos Santos
Presidente



SOQUÍMICA

Sociedade de Representações e Química, Lda.

Rua Coronel Santos Pedroso, 15 • 1500 LISBOA • Tel.: 716 51 60 • Fax: 716 51 69

Sede Social: Av. da Liberdade, 220-2º • 129 LISBOA CODEX

Rua 5 de Outubro, 269 • 4100 PORTO • Tels.: 609 30 69 • Fax: 600 08 34

Email: soquimica@mail.telepac.pt; Internet: www.soquimica.pt