

FORMAÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS CARBÔNÍCOS NO ESTADO TRIPLETE A PARTIR DE SUBSTRATOS ENÓLICOS: UMA ABORDAGEM CINÉTICA.

Wilhelm J. Baader

*Instituto de Química – Universidade de São Paulo
Cidade Universitária – CP 20.780 – CEP 01498 – São Paulo*

Recebido em 10/05/89

ABSTRACT

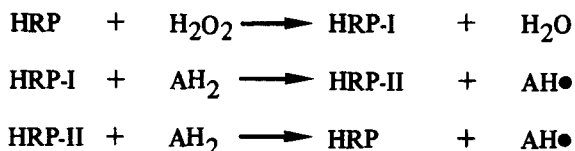
Investigation of the kinetics of the horseradish-peroxidase catalyzed oxidation of silyl enol ethers clearly shows that the free enol, generated by hydrolyses of the enol ethers, is the reactive substrate. Addition of oxygen to the enzymatically formed substrate radical ultimately leads to the generation of excited carbonyl compounds, which manifest their presence via chemiluminescence emission.

Application of the steady state approximation to the proposed mechanistic scheme yields kinetic equations which were investigated for several important boundary conditions. In agreement with the experimental results, various factors can become limiting for the reaction rate.

Using an enolic form of an ester, chemiluminescence emission and oxygen consumption can be observed, even though no reaction occurs with the ester itself. Therefore, the enolic form also appears to be the reactive substrate in the peroxidase catalyzed oxidation of esters.

INTRODUÇÃO

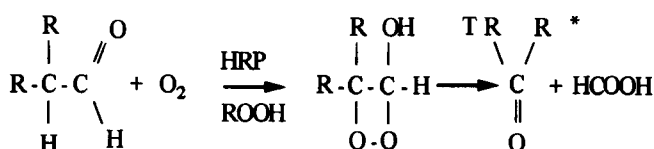
Peroxidasas catalisam a oxidação de uma grande variedade de moléculas orgânicas utilizando peróxidos como co-substratos. O ciclo catalítico de tais reações de peroxidase envolve geralmente dois intermediários, composto-I e composto-II, capazes de abstrair um elétron do substrato, formando um radical livre.¹ Para a peroxidase de raiz forte (HRP - "horseradish peroxidase"), o ciclo de oxidação-redução é bem conhecido:²⁻³



Os radicais AH• formados estabilizam-se através de reações secundárias como dimerização, desproporcionamento ou adição de oxigênio molecular.¹ Com substratos apropriados, as reações secundárias podem levar à formação de compostos eletronicamente excitados.⁴

A oxidação de aldeídos contendo hidrogênio na posição α catalisada por HRP é acompanhada de emissão de luz na região do visível. O consumo de oxigênio desta reação mos-

tra um comportamento cinético de ordem zero, ou seja, a velocidade de consumo independe da concentração de oxigênio. Os produtos da reação são os esperados da clivagem de um intermediário do tipo dioxetano; um dos compostos carbonílicos é formado no estado excitado triplete.⁵



Estudos com dioxetanos isolados mostram que estes peróxidos cíclicos de quatro átomos levam preferencialmente à formação de estados excitados triplete.⁶ Por exemplo, a decomposição de dioxetanos substituídos com grupos metilas conduz à formação de compostos carbonílicos excitados (rendimento quântico 0,01 a 0,30), preferencialmente no estado triplete.⁷

Em estudos anteriores^{8,9} foi mostrado que, na oxidação de isobutiraldeído (IBAL) o verdadeiro substrato da peroxidase é a forma enólica do aldeído. O passo limitante da reação é a formação do enol a partir da forma cetônica — a forma mais estável do aldeído. Estas observações nos levaram a investigar a oxidação de formas enólicas estáveis dos aldeídos isobutanol e propanal, isto é, os correspondentes trimetilsilil enol éter derivados¹⁰.

Ácidos e ésteres com hidrogênio na posição α , ao contrário do verificado para aldeídos, não sofrem oxidação em velocidade apreciável pelo sistema HRP/H₂O₂. Este comportamento está de acordo com o fato de que o equilíbrio ceto-enólico para ácidos e ésteres é totalmente deslocado para a forma cetônica, ou seja a constante $K_{\text{enol}} = [\text{enol}]/[\text{ceto}]$ é muito menor para estes compostos do que para aldeídos.¹¹ Utilizando-se um silil ceteno acetal como o trimetilsilil acetal do isobutirato de etila, pode-se esperar que, pela hidrólise deste composto, seja gerada a forma enólica em concentração suficientemente elevada, para que se possa observar uma reação com peroxidase.

Esta reação pode servir como modelo para o sistema da α -oxidação de plantas que converte ácidos graxos ao aldeído homólogo imediatamente mais curto e CO₂, eventualmente via um intermediário hidroperoxidico.¹² Emissão de luz neste sistema já foi observada na presença de clorofila como sensibilizador da quimiluminescência.¹³

O trabalho aqui apresentado tem como objetivo estudar

o comportamento cinético destes sistemas. Aplicando-se a aproximação de estado estacionário ao esquema mecanístico postulado obtêm-se equações cinéticas para várias condições de contorno. A validade destas equações será avaliada através da comparação direta com resultados experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes comerciais foram fornecidos pelas companhias Aldrich, Merck e Sigma. 9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e 9,10-difenilantreno-2-sulfonato de sódio (DPAS) foram sintetizados por método descrito na literatura.¹⁴ O trimetilsilil enol éter do isobutiraldeído (ITSE) (2-metil-1-(trimetilsililoxi)-1-propileno) e o trimetilsilil enol éter do propanal (PTSE) ((E/Z)-1-(trimetilsililoxi)-1-propileno) foram sintetizados pelo método de House e colabs.¹⁵ O trimetilsilil acetal do isobutirato de etila (1-etoxi-2-metil-1-(trimetilsililoxi)-1-propileno) foi sintetizado por método da literatura.¹⁶

As medidas de consumo de oxigênio foram realizadas em um aparelho da Yellow Springs Instruments, modelo 53. A velocidade do consumo de oxigênio determinada da parte linear das curvas cinéticas é dada em moles de O₂ consumido por segundo (Ms⁻¹). As cinéticas de emissão de luz foram medidas em um contador de fótons Hamamatsu HTVC 767, dotado de uma fotomultiplicadora Hamamatsu R-562. A intensidade da quimiluminescência foi medida como emissão integral em contagens por segundo (cs⁻¹).

Os estudos com os trimetilsilil enol éteres dos aldeídos foram realizados a 30°C em pH = 7,4. As soluções estoque dos substratos em etanol foram preparadas no dia do experimento. Em geral, as misturas de reação contém 0,1 mM de etilenodiamina tetraacetato de sódio (EDTA), 0,1 mM de H₂O₂ e 1 μM de HRP (Sigma, tipo VI) em tampão fosfato ou TRIS (tris(hidroximetil-aminometano) contendo etanol 0,5M, cuja finalidade é solubilizar os substratos. As reações foram iniciadas pela adição da solução de enzima, seguida pela adição do substrato.

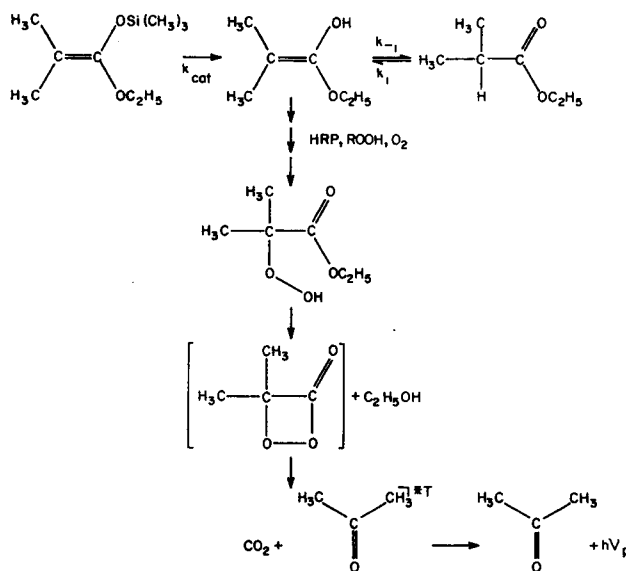
Nos estudos da variação da intensidade de emissão em função de diferentes variáveis, os valores de intensidade de emissão projetados são sempre os valores referidos para o tempo zero (intensidade inicial). O consumo de oxigênio mostra uma dependência de ordem zero na concentração de oxigênio. O fim da reação é indicado pelo declínio rápido da intensidade da emissão correspondendo ao consumo total ou o término do consumo antes de se esgotar totalmente o oxigênio. Em geral, os valores utilizados nas projeções referem-se a uma média de três determinações experimentais. Em nenhum caso o desvio padrão foi maior que 10%.

Os estudos com o trimetil acetal do isobutirato de etila foram realizados a 30°C em tampão fosfato 2,5 mM, pH = 7,4, contendo 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂, 1 mM de brometo de hexadeciltrimetilamônio (para solubilizar o substrato) e 1 μM de HRP. O substrato (160 mM), ou o etil isobutirato (160 mM), foram adicionados puros (sem diluição) para iniciar a reação.

RESULTADOS

O trimetilsilil enol éter do isobutiraldeído (ITSE) e o trimetilsilil enol éter do propanal (PTSE) sofrem hidrólise em meio aquoso a qual pode ser catalisada por espécies iônicas, como as constituintes de tampões, ou com grande eficiência por fluoreto.¹⁷⁻¹⁸ Assim as formas enólicas (enol ou eno-

lato) dos aldeídos são geradas em concentrações altas, estabelecendo-se o equilíbrio ácido-base (Esquema 1).



Esquema 1: Formação de espécies tripletes na oxidação de silil enol éteres de aldeídos catalisada pela peroxidase de raiz forte. T e hv_p representam o estado excitado triplete e a emissão de fosforescência.

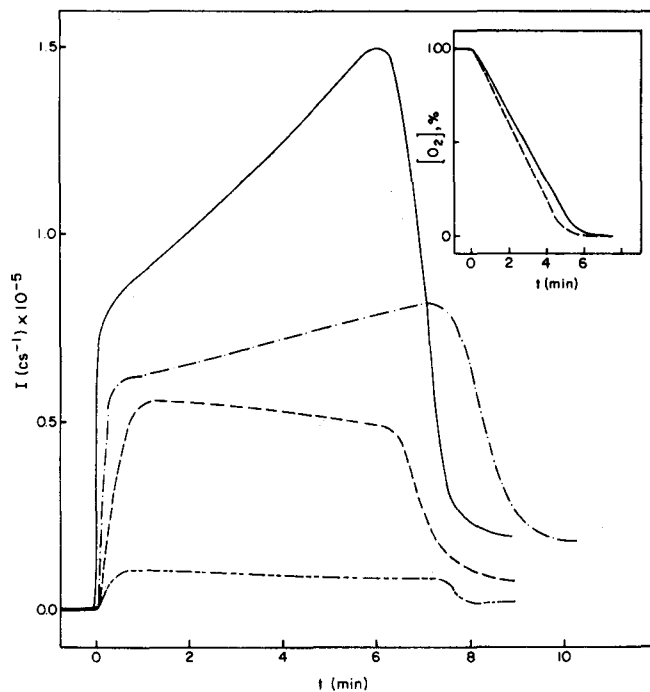


Figura 1: Cinéticas da emissão de luz na oxidação de silil enol éteres e aldeídos catalisada pela HRP. O inserto mostra a cinética do consumo de O₂ para ITSE e PTSE como substratos.

(—) [ITSE] = 16 mM; [fosfato] = 2,0 mM
 (- - -) [PTSE] = 13 mM; [TRIS] = 0,5 mM
 (- · - ·) [IBAL] = 55 mM; [fosfato] = 0,1 M
 (- · - ·) [propanal] = 150 mM; [fosfato] = 0,1 M
 40°C

A reação do enol com oxigênio catalisada por peroxidase

gera um composto carbonílico no estado triplete. A emissão desta espécie triplete (fosforescência) pode ser observada em meio aerado porque a molécula excitada está parcialmente protegida da supressão por O_2 pela enzima.⁴⁻⁵ Competindo com a reação enzimática, existe também a conversão do enol para a forma cetônica do aldeído.

A Figura 1 mostra a cinética da emissão de luz com ITSE e PTSE e, para efeito comparativo, a dos aldeídos correspondentes.

O aumento da intensidade de emissão durante o desenvolvimento da reação do ITSE e do IBAL é devido ao esgotamento do O_2 . A consequência deste esgotamento leva a uma diminuição da supressão da espécie triplete pela enzima não é total. A intensidade da emissão verificada nos sistemas com os enol éteres é mais alta com relação aquela obtida com os dos aldeídos correspondentes. Os estudos foram feitos em condições diferentes para cada substrato, de maneira a manter tempos de reação próximos com todos os substratos.

As curvas cinéticas mostradas na Figura 1 foram obtidas na presença de H_2O_2 (0,1 mM) que atua como "iniciador" da reação formando o composto reativo da HRP (HRP-1). A Figura 2 mostra a dependência da intensidade inicial de emissão, que reflete a velocidade da reação, em relação à concentração de H_2O_2 . Nota-se que a baixas concentrações de peróxido a velocidade da reação depende da concentração do iniciador peroxídico. Observa-se uma saturação a altas concentrações.

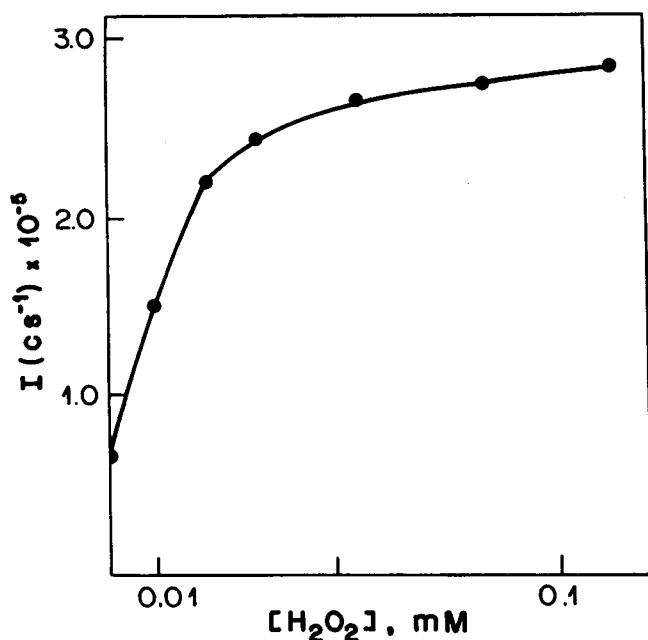


Figura 2: Dependência da intensidade da emissão inicial na oxidação de ITSE catalisada pela HRP com a concentração de peróxido (H_2O_2 adicionada).
[ITSE] = 13 mM; [fosfato] = 10 mM.

A baixas concentrações de peróxido a reação não é completa, ou seja, a emissão de luz e o consumo de oxigênio cessam antes do esgotamento de oxigênio. Ao contrário das condições padrão, nas quais a concentração de oxigênio é limitante, a concentração do peróxido presente no meio da reação torna-se agora limitante. Determinando-se o tempo

em que a reação é mantida em função da concentração de H_2O_2 adicionado, pode-se avaliar a quantidade de iniciador peroxídico necessário para completar a reação, ou seja consumo total de oxigênio. Este tempo de reação depende linearmente da concentração de H_2O_2 na região de baixas concentrações e mostra saturação na região de altas concentrações (Figura 3).

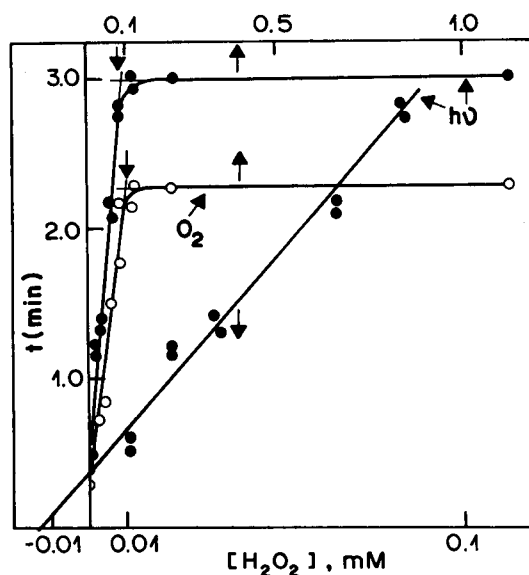


Figura 3: Dependência da duração da oxidação de ITSE catalisada pela HRP com a concentração de peróxido (H_2O_2 adicionada).
[ITSE] = 13 mM; [fosfato] = 10 mM
(●) tempo de declínio rápido da emissão de luz
(○) tempo relativo ao fim do consumo de O_2 (correspondendo ao consumo total para $[H_2O_2] \geq 0.1$ mM).

O ponto de intersecção determina a concentração de H_2O_2 adicionada necessária para terminar a reação. A reação na ausência de H_2O_2 é devida ao peróxido presente no sistema provavelmente como contaminante do substrato. A concentração deste peróxido pode ser determinada através da extrapolação da reta obtida a baixas concentrações. A soma dos dois valores, ou seja peróxido adicionado e peróxido contaminante, corresponde à quantidade do iniciador peroxídico necessário para completar a reação, ou seja, consumir totalmente o oxigênio. O valor de $(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ M de peróxido necessário para consumir 2×10^{-4} M de oxigênio (concentração de O_2 dissolvido no meio nestas condições¹⁹), mostra que uma molécula de iniciador promove o consumo de duas moléculas de oxigênio.

Em condições onde o iniciador é suficiente (10^{-4} M H_2O_2) a velocidade da reação depende somente da concentração da forma enólica presente no meio.⁹ Nos sistemas dos enol éteres, esta concentração depende da velocidade de hidrólise destes substratos. As figuras 4 a 6 mostram que esta reação é catalisada tanto pelo tampão, como pelo íon fluoreto. No caso do ITSE em tampão fosfato observa-se uma dependência linear da intensidade inicial de emissão na concentração de fosfato até 50 mM. Para concentrações mais altas houve um desvio na linearidade, provavelmente devido ao esgotamento do substrato (Figura 4). Usando-se concentrações de substrato mais altas, a dependência mostra linearidade até 0,1 M de fosfato.¹⁰

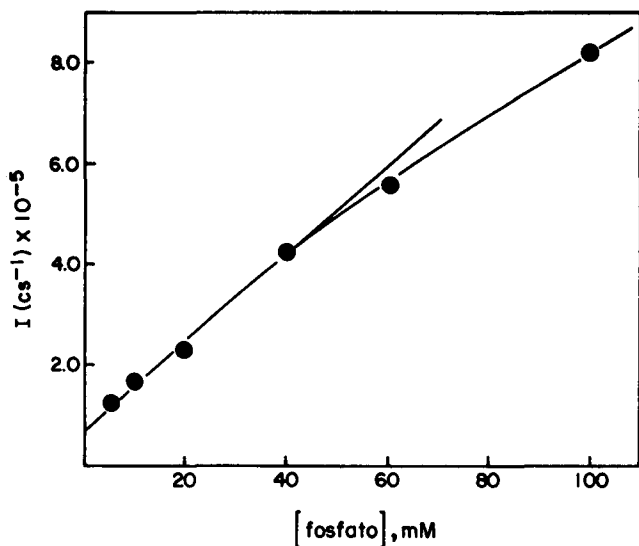


Figura 4: Efeito da concentração de fosfato sobre a velocidade da oxidação de ITSE (10 mM) catalisada pela HRP monitorada pela intensidade da emissão inicial.

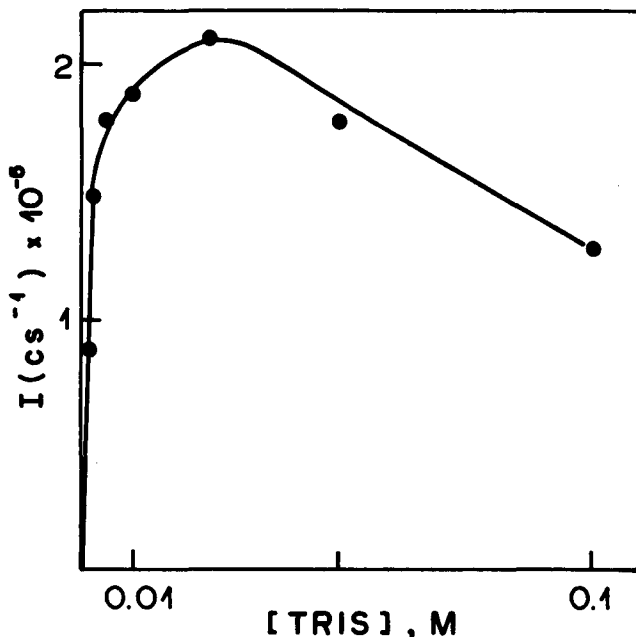


Figura 5: Efeito da concentração de TRIS sobre a velocidade da oxidação de PTSE (13 mM) catalisada pela HRP monitorada pela intensidade da emissão.

Com PTSE como substrato, a reação ocorre rapidamente também a baixas concentrações de TRIS, que catalisa a hidrólise com menor eficiência que o fosfato.¹⁰ A velocidade da reação depende linearmente da concentração de TRIS somente para baixas concentrações do tampão. A altas concentrações observa-se um decaimento da intensidade de emissão, ou seja, uma diminuição da velocidade da reação enzimática (Figura 5).

Para ambos substratos, a intensidade de emissão mostra uma dependência linear com a concentração de íon fluore-

to, indicando a atividade catalítica deste íon¹⁸ mesmo em meio aquoso.

Para ITSE como substrato, a dependência é linear até 1 mM de KF. No caso de PTSE, esta dependência é linear somente para concentrações mais baixas (até 0,1 mM), ocorrendo uma saturação a concentrações mais altas (Figura 6).

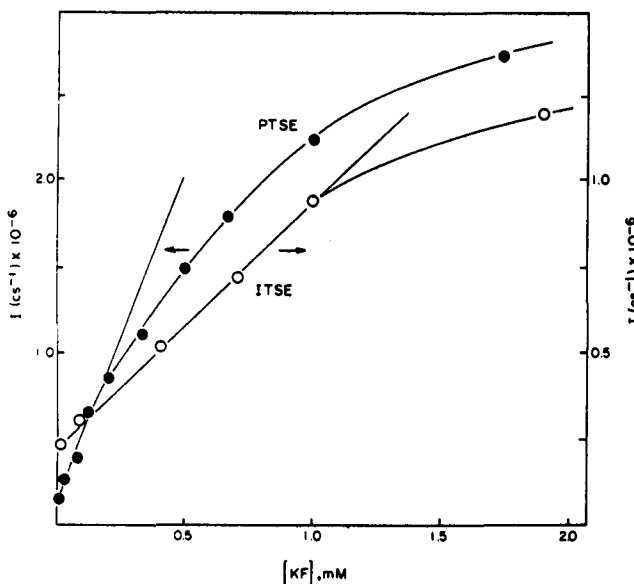


Figura 6: Efeito da concentração de KF sobre a velocidade da oxidação de ITSE e PTSE catalisada pela HRP monitorada pela intensidade da emissão.

(o) [ITSE] = 20 mM; [fosfato] = 10 mM
 (●) [PTSE] = 14 mM; [TRIS] = 5 mM

A baixas concentrações, a velocidade da reação depende linearmente da concentração do substrato. A altas concentrações obtém-se saturação para ambos os substratos (Figuras 7 e 8). Nestas condições observa-se problemas de solubilidade no meio de reação. Isto poderia ser uma razão para a não-linearidade das curvas mostradas nas Figuras 7 e 8.

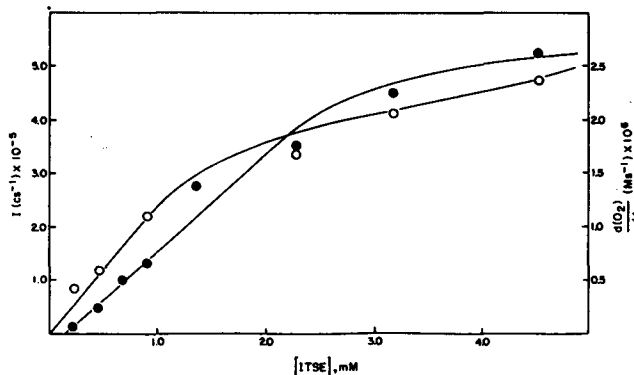


Figura 7: Dependência da velocidade da oxidação de ITSE catalisada pela HRP com a concentração de ITSE.

(●) intensidade inicial da emissão
 (o) velocidade de consumo de oxigênio;
 [fosfato] = 1 mM

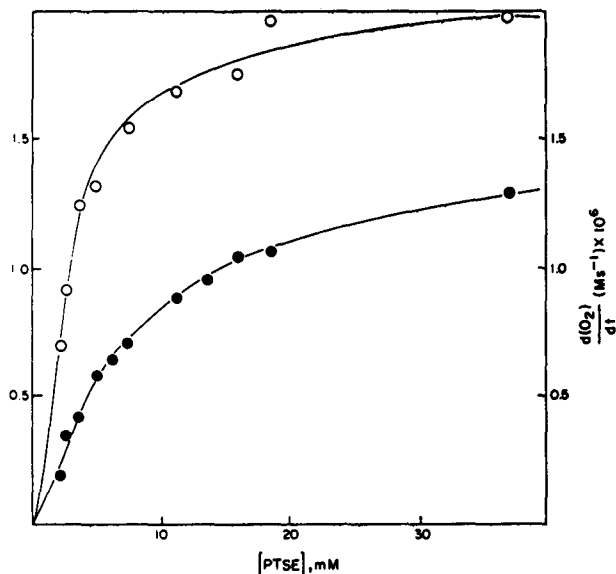


Figura 8: Dependência da velocidade da oxidação de PTSE catalisada pela HRP com a concentração de PTSE.
 (●) intensidade da emissão;
 (○) velocidade de consumo de oxigênio;
 [fosfato] = 1 mM.

Para baixas concentrações de enzima, a velocidade da reação, determinada pela velocidade de consumo de O_2 e pela intensidade de emissão, depende linearmente da concentração de HRP para ambos os substratos utilizados. Para altas concentrações de HRP obtém-se uma curva de saturação (Figura 9). Esta saturação é observada a partir de cerca

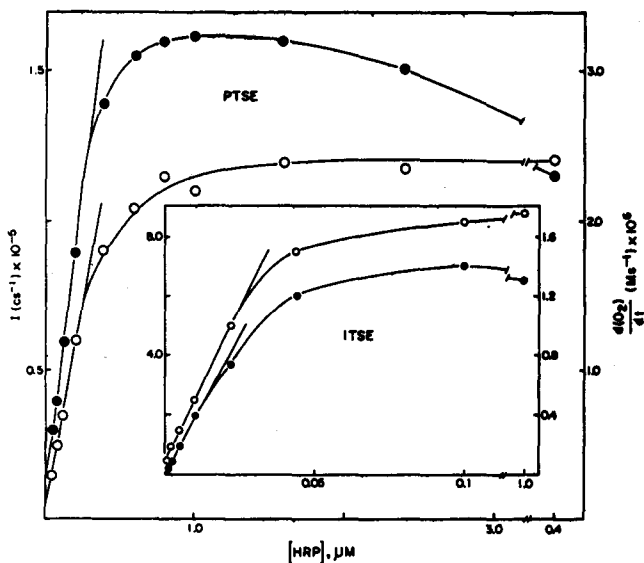


Figura 9: Dependência da velocidade da oxidação de PTSE e ITSE (inserto) catalisada pela HRP com a concentração de HRP.

(●) intensidade inicial da emissão;
 (○) velocidade de consumo de O_2 ;
 [PTSE] = 10 mM, [fosfato] = 1 mM;
 Inserto: [ITSE] = 10 mM, [fosfato] = 25 mM;
 A legenda dos eixos do inserto correspondem à da figura principal.

de $0,04 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$ de HRP para ITSE e PTSE, respectivamente. A diminuição da intensidade de emissão para altas concentrações de HRP pode ser explicada por uma supressão física da espécie triplete pela enzima.

Nestes estudos foi também utilizado um trimetilsilil derivado de um éster, o trimetilsilil acetal do isobutirato de etila. A oxidação deste substrato catalisada por HRP/ H_2O_2 na presença de O_2 é acompanhada de emissão de luz. Em condições apropriadas observa-se consumo de oxigênio (Figura 10). A emissão de luz, embora de baixa intensidade, pode ser aumentada dez vezes na presença de DBAS, um bom indicador de espécies excitadas triplete¹⁴.

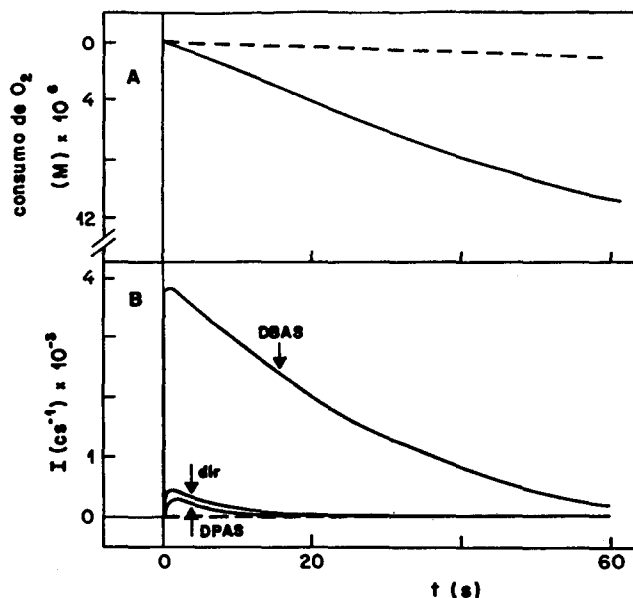


Figura 10: Cinética da emissão e do consumo de oxigênio da oxidação do trimetilsilil acetal do isobutirato de etila catalisada pela HRP.

Parte A: Consumo de oxigênio do sistema. DBAS ($30 \mu\text{M}$) ou DPAS ($80 \mu\text{M}$) não alteram a cinética. (----) controle com isobutirato de etila.

Parte B: Emissão do sistema sem sensibilizador (dir), em presença de DBAS ($30 \mu\text{M}$) ou DPAS ($80 \mu\text{M}$). (----) controle com isobutirato de etila.

Ao contrário, com DPAS, que amplifica somente a emissão de espécies excitadas no estado singlete,¹⁴ observa-se uma supressão da emissão. A intensidade máxima de emissão é observada imediatamente após a adição do substrato seguida de um rápido decaimento. O tempo de vida médio é de aproximadamente 20 segundos. Concomitantemente ocorre a interrupção do consumo de O_2 . A adição de íon fluoreto no meio da reação não produz nenhum efeito, tanto no consumo de O_2 , como na emissão.

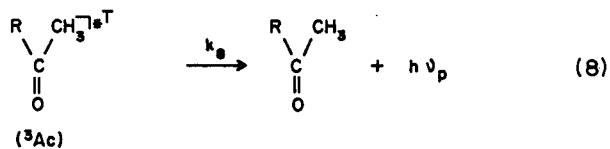
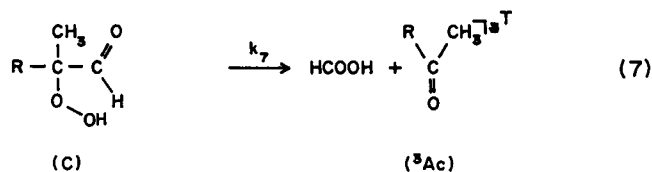
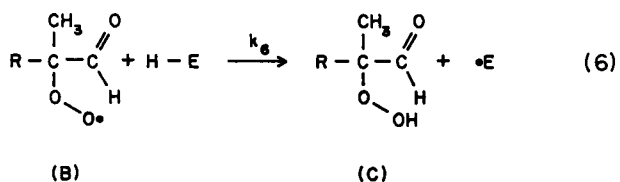
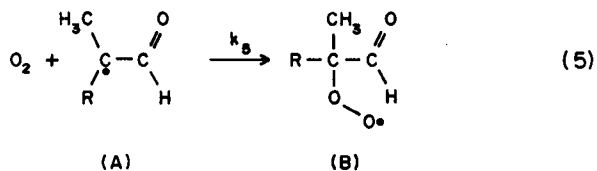
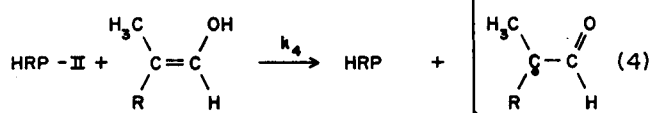
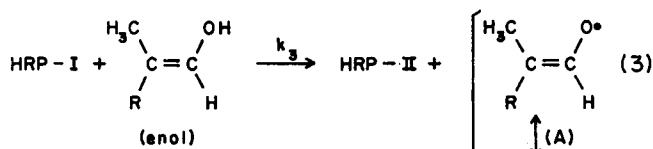
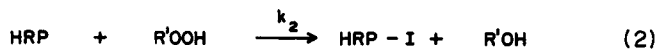
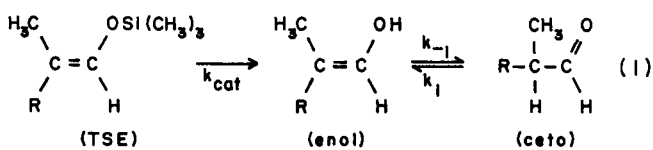
Em experiências de controle com isobutirato de etila como substrato, não se observa emissão de luz, havendo consumo de O_2 dez vezes mais lento que o obtido com o substrato na forma enólica (Figura 10).

DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos e com base em modelos conhecidos^{4, 5, 10} foi proposto um mecanismo (esquema 2) para a oxidação da forma enólica de aldeídos catalisada por HRP em presença de peróxido. O primeiro passo da rea-

ção (equação 1) corresponde à hidrólise do silil enol éter fornecendo a forma enólica do aldeído (enol) que, em solução, encontra-se em equilíbrio com a forma cetônica (ceto). As equações 2 a 4 representam o ciclo convencional da peroxidase (HRP)^{2,3}. A enzima nativa é convertida à peroxidase composto-1 (HRP-I) pela ação do peróxido (R'OOH) (equação 2). HRP-I reage com o enol formando o radical A que é estabilizado por ressonância e transforma-se no composto-II da peroxidase (HRP-II). A reação da HRP-II com enol também gera o radical A e regenera a enzima nativa (equação 4). Estudos da cinética transiente do sistema IBAL/HRP/H₂O₂/O₂ mostram que a forma enólica protonada é a espécie reativa e não a forma desprotonada, o enolato.²⁰

O oxigênio adiciona-se ao carbono α do radical A, gerando no ciclo enzimático, levando à formação do radical α-peroxi B (equação 5). Este abstrai um hidrogênio da enzima (H-E) formando o α-hidroperóxido C (equação 6) e, por uma reação rápida provavelmente via um dióxetano intermediário, são formados os produtos de clivagem: ácido fórmico e o composto carbonílico (acetona ou acetaldeído) no estado excitado triplete (³Ac) (equação 7). Este manifesta-se pela emissão de fosforescência (hν_p) (equação 8).



Esquema 2: Mecanismo da oxidação de silil enol éteres de aldeídos catalisada pela HRP.

R representa CH₃ ou H; R'OOH substitui H₂O₂ ou o hidroperóxido produzido na autooxidação do substrato; T e hν_p representam o estado excitado triplete e a emissão de fosforescência.

O átomo de hidrogênio deve ser abstraído no micro-ambiente da enzima onde foi formada a espécie radicalar, tanto da forma HRP-II como da forma HRP. Ou seja, H-E representa tanto HRP quanto HRP-II. Portanto, a geração do radical A seguida pela formação do radical B, ocorre em contacto com HRP-II (equação 3 seguida das equações 5 e 6) ou com HRP (equação 4 seguida das equações 5 e 6), já que o produto excitado é formado protegido pela enzima.^{10,21} O átomo de hidrogênio pode ser abstraído do resíduo de açúcar localizado próximo ao sítio ativo da enzima.²² A enzima pode ser recuperada a partir do radical E• pela ação do etanol presente no sistema para solubilizar o substrato.⁹

De acordo com o mecanismo aqui proposto, uma molécula de iniciador (R'OOH) leva à formação de duas moléculas de acetona, parte no estado triplete, ou seja duas moléculas de oxigênio são consumidas. Os resultados obtidos (Figura 3, vide Resultados) apresentam excelente concordância com a estequiometria prevista pelo mecanismo sugerido.

Aplicando-se a aproximação de estado estacionário aos intermediários HRP, HRP-I, HRP-II, enol, radicais A e B, hidroperóxido C e acetona triplete (³Ac) envolvidos no mecanismo mostrado no esquema 2 (vide equações 9-17, Apêndice) obtém-se expressões equivalentes para a velocidade de consumo de O₂ e para a intensidade de emissão de luz (equações 25 e 26, Apêndice). Usando-se condições de contorno, foram obtidas expressões de velocidade da reação para vários casos interessantes:

Condição A: Para concentrações baixas de peróxido (R'OOH), ou seja, no caso onde a reação de iniciação (equação 2) torna-se a etapa limitante da velocidade da reação:

$$k_4 [\text{enol}] \gg k_2 [\text{R}'\text{OOH}]$$

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = I_p = 2k_2 [\text{R}'\text{OOH}] [\text{E}]_0 \quad (27)$$

Nestas condições, a velocidade da reação apresenta uma dependência linear com a concentração de R'OOH e a con-

centração total da enzima ($[E]_0$). A Figura 2 mostra que para concentrações baixas de peróxido a velocidade da reação, ou seja, a intensidade da emissão, é linearmente dependente da concentração do peróxido adicionado. Isto está de acordo com a proposta contida na equação 27.

Condição B: Para concentrações altas de peróxido, ou seja, para o caso onde a etapa de iniciação (equação 2) não é a limitante da velocidade da reação:

$$k_4 [\text{enol}] \ll k_2 [R'OOH]$$

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = 2k_4 [\text{enol}] [E]_0 \quad (28)$$

Neste caso, a concentração da enzima ($[E]_0$) e a concentração do enol no estado estacionário são os fatores limitantes para a velocidade da reação.

Usando-se a aproximação de estado estacionário para o enol (equação 9), obtém-se (vide Apêndice):

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = \frac{2k_4 k_{\text{cat}} [\text{TSE}] [E]_0}{k_{-1} + 2k_4 [E]_0} \quad (33)$$

Com base na equação 33 podem ser estudados os casos limite considerando a reação da enzima com o enol (equações 3 e 4) muito mais rápida que a cetonação (passo k_{-1} na equação 1) e vice-versa:

$$\text{Caso I: } 2k_4 [E]_0 \gg k_{-1}$$

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = k_{\text{cat}} [\text{TSE}] \quad (34)$$

Esta equação é válida para concentrações altas da enzima, para substratos que apresentam valores baixos de k_{-1} ou em condições que não favoreçam a cetonação. A velocidade da reação, neste caso, depende linearmente da concentração do trimetilsilil enol éter (TSE) e da constante da velocidade da hidrólise (k_{cat}). Esta por sua vez, depende da natureza do substrato e está sujeita a alterações causadas pela concentração e constituição do tampão e pela presença de íons fluoreto. Nestes casos, k_{cat} pode ser expressa pela k_{cat}' que leva em conta a catálise pelo tampão e por fluoreto (CAT corresponde ao tampão ou ao F⁻):

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{cat}}' [\text{CAT}]$$

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = k_{\text{cat}}' [\text{CAT}] [\text{TSE}] \quad (34a)$$

A velocidade da reação depende, portanto, da concentração do substrato e da natureza e da concentração do tampão e/ou da concentração de fluoreto. O tampão, ao contrário do fluoreto, também influencia as constantes de velocidade de enolização (k_1) e de cetonação (k_{-1}):

$$k_1 = k_1' [\text{tampão}]; k_{-1} = k_{-1}' [\text{tampão}]$$

$$\text{Caso II: } 2k_4 [E]_0 \gg k_{-1}$$

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = \frac{2k_4 k_{\text{cat}}}{k_{-1}} [E]_0 [\text{TSE}] \quad (35)$$

Esta equação é válida para concentrações baixas da enzima, para substratos que apresentam altas constantes de velocidades da cetonação (k_{-1}) ou em condições de altas concentrações de tampão.

A validade das equações acima pode ser comprovada, confrontando-as com os resultados experimentais. Para ITSE como substrato, observa-se uma dependência linear da velocidade da reação com a concentração de fosfato até 50 mM (Figura 4), mostrando que a equação 34a é válida nestas condições experimentais.

Com PTSE como substrato, a dependência linear só se verifica para baixas concentrações de tampão, neste caso TRIS. Para altas concentrações observa-se um decaimento da intensidade da emissão (Figura 5). Portanto, a equação 34 deixa de ser válida e a equação 35 deve ser aplicada. A velocidade da reação não mais depende da concentração de tampão, mas é determinada pelo quociente k_{cat}'/k_{-1}' característico do substrato. A diferença entre os resultados para PTSE e ITSE pode ser explicada pelo fato de que a constante da cetonação (k_{-1}) é aproximadamente 40 vezes maior para propanal do que para IBAL.^{2,3} Portanto, no caso de PTSE, as condições de contorno para a equação 35 tornam-se válidas para concentrações de tampão mais baixas que a exigida para o caso de ITSE.

A dependência da velocidade da reação pela concentração de fluoreto (Figura 6) é linear no caso do ITSE, mostrando que a equação 34a é válida nas condições experimentais. Para PTSE tal fato é verdadeiro somente a concentrações baixas de KF. A saturação obtida para concentrações mais altas de fluoreto indica que, neste caso, o passo limitante da reação não é mais a hidrólise do PTSE, ou seja, a equação 34 não é mais válida e a equação 27 deve ser aplicada.

Nota-se que sob estas condições a constante k_{-1} não deve ser afetada, ou seja, as condições de contorno para a equação 35 não podem ser aplicadas, pois, não se observa um decaimento da intensidade da emissão para altas concentrações de fluoreto. O contrário foi verificado para o caso de altas concentrações de tampão.

Concordando com a equação 34, a dependência da velocidade da reação com a concentração do substrato mostra, em ambos os casos, uma região linear para concentrações baixas (Figuras 7 e 8). A não-linearidade observada para concentrações altas pode ser explicada pela mudança da natureza do passo limitante, ou seja, a concentração do enol no estado estacionário deixa de ser crítica. Neste caso, a

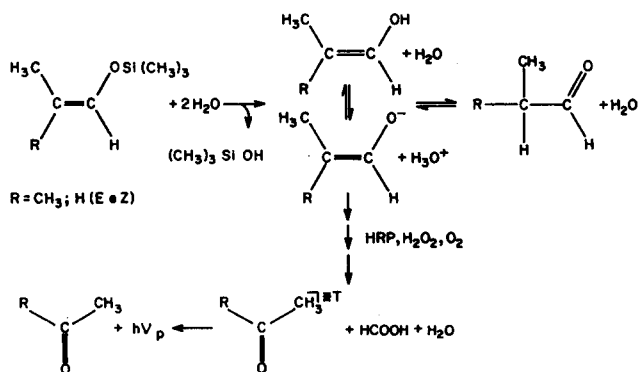
equação 27 e não a equação 34 é que explica o comportamento cinético. Deve-se também levar em conta a possibilidade de que a não-linearidade, para concentrações altas do substrato, seja consequência de uma dissolução parcial deste.

Da parte linear dos gráficos de velocidade de consumo de oxigênio (Figuras 7 e 8), podem ser calculadas as constantes de hidrólise dos substratos catalisada por fosfato. Da equação 34a e das inclinações das retas, obtém-se $k_{cat}' = 0,053 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para ITSE e $k_{cat}' = 0,26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para PTSE, mostrando que a hidrólise em fosfato é 5 vezes mais rápida para PTSE do que para ITSE.

A dependência da velocidade da reação em relação à concentração da enzima (Figura 9) mostra que em condições de baixas concentrações de HRP a equação 35 é válida. A velocidade mostra dependência linear com a concentração da enzima. Como existe peróxido suficiente no meio da reação, a equação 27 não se aplica neste caso. Para concentrações de HRP mais altas obtém-se saturação, indicando que a velocidade da reação não depende mais da concentração da enzima, ou seja a equação 34 passa a ser válida. Para ITSE observa-se saturação para uma concentração de enzima 25 vezes mais baixa do que para PTSE, refletindo a diferença entre as constantes da cetonação (vide condições de contorno para a equação 34).

Os resultados demonstram que, dependendo das condições experimentais, diferentes etapas tornam-se limitantes da velocidade da reação. Este fato está de acordo com o conjunto das equações obtidas a partir do modelo mecanístico proposto, levando em conta diferentes condições de contorno.

Em analogia com os silil enol derivados dos aldeídos, esperava-se que com o trimetilsilil acetal do isobutirato de etila, fosse possível observar uma reação da peroxidase com a forma enólica do éster formada através da hidrólise do substrato (esquema 3).



Esquema 3: Formação de espécies excitadas na oxidação do trimetilsilil acetal do isobutirato de etila catalisada pela HRP. T e $h\nu_p$ representam o estado excitado triplete e a emissão de fosforescência.

De forma semelhante ao mecanismo postulado para os silil enol éteres, espera-se que seja formado um hidroperóxido como intermediário. Sua ciclização resultaria numa α -peroxilactona, um intermediário instável. A clivagem da α -pe-

roxilactona deve produzir acetona triplete em quantidades consideráveis e eventualmente acetona excitado no estado singlete.²⁴

Os resultados obtidos com este substrato mostram que, usando-se a forma enólica de um éster, pode-se observar consumo de oxigênio e emissão de luz em condições nas quais o próprio éster não reage. Empregando-se os sensibilizadores DBAS (para espécies tripletes) e DPAS (para espécies singletes)¹⁴, foi possível verificar que a reação produz exclusivamente, ou pelo menos predominantemente, espécies excitadas no estado triplete.

O lento consumo de oxigênio associado a uma quimiluminescência pouca intensa podem estar associados com os seguintes fatos:

(i) A hidrólise do silil acetal não conduz à forma enólica, mas forma diretamente o éster. Neste caso, a hidrólise é iniciada pela adição de um próton ao carbono α .⁷ A observação de que a adição do íon fluoreto ao meio da reação não altera os resultados pode ser tomada como um argumento contrário a esta explicação, este porque a hidrólise catalisada pelo fluoreto deve sempre levar à formação intermediária da forma enólica.¹⁸

(ii) Mesmo se a forma enólica é formada, a alta velocidade da cetonação¹¹ levará a uma baixa velocidade de reação (vide esquema 35). Portanto o decaimento rápido da intensidade de emissão é devido ao esgotamento do substrato pela via da cetonação.

Em conclusão, a abordagem cinética destes sistemas evidencia que a forma enólica de aldeídos é de fato a espécie reativa na geração de compostos carbonílicos no estado triplete catalisada pela peroxidase. O esquema proposto para o mecanismo da reação está de acordo com as observações experimentais. A velocidade de formação do enol através da hidrólise do silil enol éter, a concentração de peróxido ou a concentração da enzima podem ser os fatores limitantes da velocidade de reação.

O uso dos silil enol éteres como substratos para peroxidase apresenta várias vantagens:

(i) podem ser utilizadas concentrações mais baixas de tampão e substrato, (ii) a velocidade da reação pode ser controlada com fluoreto, (iii) a reação pode ser efetuada mesmo em temperaturas próximas a 0°, (iv) a intensidade de luz emitida no sistema de ITSE é suficientemente alta para ser observada a olho nú, e (v) a emissão pode ser fotografada desde que DBAS esteja presente no meio da reação²⁵.

Usando uma forma enólica estável do isobutirato de etila, são observados emissão de luz, embora fraca, e consumo de oxigênio, embora lento, em condições em que o éster não reage. O composto carbonílico excitado é formado exclusivamente, ou pelo menos predominantemente, no estado triplete.

AGRADECIMENTOS:

O autor deseja expressar sua gratidão ao professor G. Cilento pelo apoio e assistência constante, e também aos professores E. J. H. Bechara e R. C. de Baptista pela leitura crítica do manuscrito. Este trabalho foi beneficiado pelo apoio financeiro da FAPESP, FINEP, CNPq, Fundação Volkswagen (Hannover, FRG) e GTZ (Eschborn, FRG).

APÊNDICE

Aproximação de estado estacionário aplicada às equações 1-8 do esquema 2:

$$\frac{d[\text{enol}]}{dt} = k_{\text{cat}}[\text{TSE}] + k_1[\text{ceto}] - k_{-1}[\text{enol}] - k_3[\text{HRP-I}] - k_4[\text{HRP-II}][\text{enol}] = 0 \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{HRP}]}{dt} = k_4[\text{HRP-II}][\text{enol}] - k_2[\text{HRP}][\text{R'OOH}] = 0 \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{HRP-I}]}{dt} = k_2[\text{HRP}][\text{R'OOH}] - k_3[\text{HRP-I}][\text{enol}] = 0 \quad (11)$$

$$\frac{d[\text{HRP-II}]}{dt} = k_3[\text{HRP-I}][\text{enol}] - k_4[\text{HRP-II}][\text{enol}] = 0 \quad (12)$$

$$\frac{d[\text{A}]}{dt} = k_3[\text{HRP-I}][\text{enol}] + k_4[\text{HRP-II}][\text{enol}] - k_5[\text{A}][\text{O}_2] = 0 \quad (13)$$

$$\frac{d[\text{B}]}{dt} = k_5[\text{A}][\text{O}_2] - k_6[\text{B}][\text{H} \cdot \text{E}] = 0 \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{C}]}{dt} = k_6[\text{B}][\text{H} \cdot \text{E}] - k_7[\text{C}] = 0 \quad (15)$$

$$\frac{d[{}^3\text{Ac}]}{dt} = k_7[\text{C}] - k_T[{}^3\text{Ac}] = 0 \quad (16)$$

$$\frac{d[\text{hv}]}{dt} = k_8[{}^3\text{Ac}] = I_p \quad (17)$$

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = k_5[\text{A}][\text{O}_2] \quad (18)$$

k_T representa a soma das constantes de velocidade de desativação do composto carbonílico triplete.

k_8 representa a constante de velocidade de desativação radiativa, ou seja, a constante de fosforescência.

I_p significa a intensidade de emissão, normalizada pelo rendimento quântico de fosforescência.

Para a concentração da enzima total ($[E]_0$) pode-se escrever:

$$[E]_0 = [\text{HRP}] + [\text{HRP-I}] + [\text{HRP-II}] \quad (19)$$

Substituindo-se as equações 10-12 na equação 19 obtém-se:

$$[\text{HRP}] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_2[\text{R'OOH}]}{k_3[\text{enol}]} + \frac{k_2[\text{R'OOH}]}{k_4[\text{enol}]}} \quad (20)$$

$$[\text{HRP-I}] = \frac{[E]_0}{\frac{k_3[\text{enol}]}{k_2[\text{R'OOH}]} + 1 + \frac{k_3}{k_4}} \quad (21)$$

$$[\text{HRP-II}] = \frac{[E]_0}{\frac{k_4[\text{enol}]}{k_3[\text{R'OOH}]} + \frac{k_4}{k_3} + 1} \quad (22)$$

Substituindo-se as equações 12 e 22 na equação 13, obtém-se:

$$[\text{A}] = \frac{2k_4[E]_0[\text{enol}]}{k_5[\text{O}_2] \left(\frac{k_4[\text{enol}]}{k_2[\text{R'OOH}]} + \frac{k_4}{k_3} + 1 \right)} \quad (23)$$

Substituindo-se a equação 23 na equação 14, obtém-se:

$$[\text{B}] = \frac{2k_4[E]_0[\text{enol}]}{k_6[\text{H} \cdot \text{E}] \left(\frac{k_4[\text{enol}]}{k_2[\text{R'OOH}]} + \frac{k_4}{k_3} + 1 \right)} \quad (24)$$

Combinando-se as equações 15 a 17, obtém-se:

$$\frac{d[\text{hv}]}{dt} = \Phi_T k_8 [\text{B}] [\text{H} \cdot \text{E}]$$

Φ_T significa o rendimento quântico de radiação do estado triplete (rendimento quântico de fosforescência), ou seja, o quociente k_8 sobre k_T .

Com a equação 24:

$$\frac{d[hv]}{dt} = \frac{\Phi_T 2k_4[E]_o[enol]}{\frac{k_4[enol]}{k_2[R'OOH]} + \frac{k_4}{k_3} + 1} \quad (25)$$

Substituindo-se a equação 23 na equação 18, obtém-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{2k_4[E]_o[enol]}{\frac{k_4[enol]}{k_2[R'OOH]} + \frac{k_4}{k_3} + 1} \quad (26)$$

Das equações 25 e 26, conclui-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{d[hv]}{dt} \times \frac{1}{\Phi_T} = I_p$$

Aplicando-se as condições de contorno pode-se simplificar a expressão da velocidade da reação.

A velocidade da reação do enol com HRP-I é dez vezes maior que a velocidade da reação com HRP-II.²⁰

$$k_3 \gg k_4 \quad \text{ou seja,} \quad \frac{k_4}{k_3} \ll 1$$

Condição A:

$$k_4[enol] \gg k_2[R'OOH] \quad \text{ou seja,} \quad \frac{k_4[enol]}{k_2[R'OOH]} \gg 1$$

Das equações 25 e 26, obtém-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = 2k_2[R'OOH][E]_o \quad (27)$$

Esta equação é válida para concentrações baixas de peróxidos [R'OOH].

Condição B:

$$k_4[enol] \ll k_2[R'OOH] \quad \text{ou seja,} \quad \frac{k_4[enol]}{k_2[R'OOH]} \ll 1$$

Esta condição é válida para concentrações altas de peróxido

[R'OOH], ou seja a "iniciação" (esquema 2) não é limitante para a reação.

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = 2k_4[enol][E]_o \quad (28)$$

Das equações 20 e 22 obtém-se:

$$\text{Para a condição A: } [HRP] = [E]_o \quad (29)$$

$$\text{Para a condição B: } [HRP-II] = [E]_o \quad (30)$$

Substituindo-se as equações 12 e 30 na equação 9, obtém-se:

$$[enol] = \frac{k_{cat}[TSE] + k_1[ceto]}{k_{-1} + 2k_4[E]_o} \quad (31)$$

Como a velocidade da formação do enol a partir da forma cetônica ($k_1[ceto]$) é muito menor do que aquela a partir de TSE, ($k_{cat}[TSE]$) pode-se simplificar a equação 31:

$$[enol] = \frac{k_{cat}[TSE]}{k_{-1} + 2k_4[E]_o} \quad (32)$$

Substituindo-se a equação 32 na equação 28, obtém-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = \frac{2k_4 k_{cat}[TSE][E]_o}{k_{-1} + 2k_4[E]_o} \quad (33)$$

Aplicando-se dois casos limites na equação 33:

I: Quando a reação do enol com a enzima é mais rápida que a cetonização ($2k_4[E]_o \gg k_{-1}$), obtém-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = k_{cat}[TSE] \quad (34)$$

Esta equação é válida para altas concentrações da enzima total ($[E]_o$) e valores baixos de k_{-1} .

Uma avaliação para o caso do ITSE (com valores da literatura obtido em tampão fosfato, força iônica 0,67M e pH = 7,4)^{20, 23} usando $[E]_o = 1 \mu M$, leva a $k_{-1} = 0,05 s^{-1}$ $2k_4[E]_o = 2,6 s^{-1}$. Neste caso, $2k_4[E]_o = k_{-1}$ para concentração da enzima de $0,02 \mu M$, ou seja, a equação 34 é válida para valores de $[E]_o$ significativamente mais altos que esta concentração.

II: Quando a cetonização é mais rápida que a reação do enol com a enzima ($k_{-1} \gg 2k_4[E]_o$), obtém-se:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = I_p = \frac{2k_4 k_{cat}}{k_{-1}} [E]_o [TSE] \quad (35)$$

Esta condição é válida quando a concentração da enzima é baixa, ou a velocidade de cetonização catalisada pelo tampão é alta.

REFERÊNCIAS

- ¹ Yamazaki, I. em "Free Radicals in Biology" (Pryer, W. A., ed.) Vol. 3, 183-218, Academic Press; New York (1977).
- ² Chance, B.; *Arch. Biochem. Biophys.* (1952) 41, 416.
- ³ George, P.; *Biochem. J.* (1953) 54, 267.
- ⁴ Cilento, G.; *Pure Appl. Chem.* (1984) 56, 1179.
- ⁵ Bechara, E. J. H.; Faria Oliveira, O. M. M.; Durán, N.; Casadei de Baptista, R.; Cilento, G.; *Photochem. Photobiol.* (1979) 30, 101.
- ⁶ Adam, W. em "Chemical and Biological Generation of Excited States" (Adam, W.; Cilento, G., eds.) 115; Academic Press; New York (1982).
- ⁷ Adam, W.; Baader, W. J.; *J. Am. Chem. Soc.* (1985) 107, 410.
- ⁸ Dunford, H. B.; Baader, W. J.; Bohne, C.; Cilento, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) 122, 28.
- ⁹ Baader, W. J.; Bohne, C.; Cilento, G.; Dunford, H. B.; *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 10217.
- ¹⁰ Adam, W.; Baader, W. J.; Cilento, G.; *Biochim. Biophys. Acta* (1986) 881, 330.
- ¹¹ Toullic, J. em "Advances in Physical Organic Chemistry" (Gold, V.; Bethell, D.; eds.) Vol. 18, 1, Academic Press; London (1982).
- ¹² Shine, W. E.; Stumpf, P. K.; *Arch. Biochem. Biophys.* (1974) 162, 147.
- ¹³ Salim-Hanna, M.; Campa, A.; Cilento, G.; *Photochem. Photobiol.* (1987) 45, 849.
- ¹⁴ Catalani, L. H.; Wilson, T.; Bechara, E. J. H.; *Photochem. Photobiol.* (1987) 45, 273.
- ¹⁵ House, H. O.; Czuba, L. J.; Gall, M.; Olmstead, H. D.; *J. Org. Chem.* (1969) 34, 2324.
- ¹⁶ Ainsworth, C.; Chen, F.; Kuo, Y. -N.; *J. Organometal. Chem.* (1972) 46, 59.
- ¹⁷ Novice, M. H.; Seikaly, H. R.; Seiz, A. D.; Tidwell, T. T.; *J. Am. Chem. Soc.* (1980) 102, 5835
- ¹⁸ Kuwajima I.; Nakamura, E.; *Acc. Chem. Res.* (1985) 18, 181.
- ¹⁹ Robinson, J.; Cooper, J. M.; *Anal. Biochem.* (1970) 33, 390.
- ²⁰ Bohne, C.; MacDonald, I. D.; Dunford, H. B.; *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 3572
- ²¹ Rivas-Suárez, E.; Cilento, G.; *Biochemistry* (1981) 20, 7329.
- ²² Tadros, L. K.; Andrei, D.; Montas, C.; *Rev. Roum. Biochim.* (1983) 20, 293.
- ²³ Bohne, C.; MacDonald, I. D.; Dunford, H. B.; *J. Am. Chem. Soc.* (1986) 108, 7867.
- ²⁴ Adam, W.; Cilento, G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1983) 22, 529.
- ²⁵ Baader, W. J.; Bohne, C.; Cilento, G.; Nassi, L.; *Biochem. Educat.* (1986) 14, 190.