Silvia Helena Libardi

Cinética e mecanismo de redução de espécies de ferro-heme hipervalentes pelo H₂S, cisteína e CO em relação à proteção do trato gastrointestinal e a qualidade da carne

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2014

Aos meus pais José e Maria

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso, por sua dedicada orientação, confiança e amizade.

Ao Prof. Leif H. Skibsted pela dedicada supervisão durante o doutorado sanduíche.

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida.

Ao CNPq, pela bolsa do programa Ciência sem Fronteiras (Processo CNPq - CsF 202534/2011-1).

À FAPESP pelo aporte financeiro FAPESP (BEAM 2011/51555-7 e 2009/00808-0).

Ao Grupo de Química Inorgânica e Analítica e todos os seus respectivos membros.

Ao Department of Food Science, Faculty of Science, University of Copenhagen.

À Central de Análises Químicas e Instrumentais – CAQI pela disponibilização de sua estrutura.

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges e ao grupo de Biologia Molecular e Bioquímica – BMB e seus integrantes pelas discussões, ensinamentos e disponibilização de estrutura.

Ao Prof. Antonio Gilberto (Giba) – UFSCar e ao Dr. Eduardo S. P. do Nascimento pelo auxílio e acesso ao RMN de 600MHz com sonda criogênica alocado DQ-UFSCar.

Ao Instituto de Química de São Carlos e ao seu corpo docente e técnico pela formação acadêmica.

Ao serviço de biblioteca e informação da Biblioteca Prof. Johannes Rudiger Lechat do Instituto de Química de São Carlos e aos seus funcionários.

Às secretárias da Pós-Graduação e do Departamento de Química e Física Moleculares.

Aos amigos do Laboratório de Química Inorgânica e Analítica.

Agradeço em especial aos meus pais, José e Maria, pelo suporte e incentivo aos meus estudos e aos meus irmãos Luís e Paulo.

RESUMO

Estudos da reatividade de espécies oxidantes e a interação destas espécies com estruturas sensíveis a oxidação e antioxidantes em condições biológicas são de grande importância no entendimento dos processos redox em alimentos e no corpo humano. A mioglobina é a ferro heme proteína majoritária do músculo esquelético de mamíferos e a sua ativação por peróxido de hidrogênio dá origem às espécies reativas de ferro heme hipervalentes, perferrilmioglobina e ferrilmioglobina, que podem induzir a condição de estresse oxidativo. A reação das espécies de ferro heme hipervalentes com constituintes do meio biológico ou alimentos como proteínas ou membranas podem tanto afetar a qualidade de produtos cárneos quanto causar danos celulares no trato gastrointestinal durante sua digestão. Pequenas moléculas tais como o NO, H₂S e CO são produzidas endogenamente em sistemas biológicos e, além de desempenharem importantes funções na manutenção do metabolismo celular, podem apresentar atividade antioxidante. A presente Tese procurou investigar a cinética e o mecanismo para a redução das espécies perferrilmioglobina e ferrilmioglobina pelo monóxido de carbono, reação esta que apresenta constante de velocidade de segunda ordem de $k_2 = (3,3 \pm 0,6) 10^2 \text{ mol L}^{-1}$, a 25 °C, para a redução da espécie perferrilmioglobina. Posteriormente, foi investigada a cinética e mecanismo de redução da ferrilmioglobina pelo H₂S levando à formação da espécie sulfomioglobina-Fe(II). A constante de segunda ordem obtida para a reação entre a espécie protonada da ferrilmioglobina e o H₂S foi de $k_2 = (2,5 \pm 0,1) 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, duas ordens de magnitude superior a constante de velocidade para a reação entre a espécie ferrilmioglobina e o íon HS⁻, $k_2 = (1,0 \pm 0,7) 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C. Para a redução da espécie ferrilmioglobina pelo H₂S/HS⁻ e a formação da espécie sulfomioglobina-Fe(II) observa-se um efeito de compensação de temperatura ($\Delta H^\ddagger = (2,1 \pm 0,9) \text{ kJ mol}^{-1}$) o que é um fator determinante na ocorrência do processo de *greening* em produtos cárneos condimentados durante estocagem a baixa temperatura. A formação da espécie sulfomioglobina foi também investigada na reação de redução da ferrilmioglobina pela L-cisteína. Para esta reação foi observada dependência do mecanismo da reação com o pH. A formação da espécie sulfomioglobina foi observada para a reação conduzida em meio ácido a neutro, enquanto que para a reação em condições alcalinas, observa-se a formação majoritária da espécie oximioglobina. A reação da cisteína com a espécie protonada da ferrilmioglobina apresentou constante de segunda ordem de $k_2 = (5,1 \pm 0,4) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e a reação entre a cisteína diânion e a ferrilmioglobina, em meio alcalino, apresentou constante de velocidade de segunda ordem com $k_2 = (0,12 \pm 0,01) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A diferença de reatividade e no produto da reação é um indicativo da mudança de mecanismo de transferência de elétrons seguida de adição do radical HS[•], em meio ácido, para um mecanismo sequencial de transferência de elétrons do dianion da cisteína para as espécies ferrilmioglina e metamioglobina levando a formação de oximioglobina em condições alcalinas.

Palavras-chave: perferrilmioglobina, ferrilmioglobina, ferro heme hipervalente, CO, H₂S, L-cisteína, tiol, antioxidantes.

ABSTRACT

Studies on the reactivity and interaction of oxidant species with oxidizable sensitive structures and antioxidants in biological settings are of great importance for understanding the redox process in food and in the human body. Myoglobin is the major heme-iron protein in the mammal skeletal muscle and its activation by hydrogen peroxide generate reactive hypervalent heme-iron species, perferrylmyoglobin and ferrylmyoglobin, which may induce oxidative stress conditions. The reaction of hypervalent heme-iron species with biological medium or food constituents like proteins or membranes may affect the quality of meat products or could lead to cellular damage in the gastrointestinal tract during digestion. Small molecules like NO, H₂S, and CO are produced endogenously in biological systems and, despite playing relevant function in the maintenance of cell metabolism, may present antioxidant activity. The present Thesis aimed to investigate the kinetics and mechanism for the reduction of perferrylmyoglobin and ferrylmyoglobin species by carbon monoxide, reaction that shows a second-order reaction constant with $k_2 = (3.3 \pm 0.6) 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C for the reduction of the perferrylmyoglobin species. Furthermore, the kinetics and mechanism for the reduction of the ferrylmyoglobin by H₂S leading to the formation of the sulfmyoglobin-Fe(II) species has been investigated. The obtained second-order rate constant for the reaction between the protonated ferrylmyoglobin species and H₂S was $k_2 = (2.5 \pm 0.1) 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, two-orders of magnitude higher than the second-order rate constant for the reaction between the ferrylmyoglobin species and the HS⁻ ion, $k_2 = (1.0 \pm 0.7) 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C. For the ferrylmyoglobin species reduction by H₂S/HS⁻ and the formation of sulfmyoglobin-Fe(II) it is observed an temperature compensation effect ($\Delta H^\ddagger = (2.1 \pm 0.9) \text{ kJ mol}^{-1}$) which is the determination factor for the occurrence of the greening process in condiment meat products during storage at low temperature. The formation of the sulfmyoglobin species has been further investigated during the reduction reaction of ferrylmyoglobin by L-cysteine. For this reaction it was observed a dependence of the reaction mechanism on the pH. The formation of sulfmyoglobin was observed for the reaction conducted in acidic and neutral medium, meanwhile for the reaction in alkaline conditions, it is mainly observed the formation of oxymyoglobin. The reaction between cysteine and the protonated ferrylmyoglobin species shown second-order rate constant with $k_2 = (5.1 \pm 0.4) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and the reaction between the cysteine dianion and ferrylmyoglobin, in alkaline medium, shows second order rate constant with $k_2 = (0.12 \pm 0.01) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The difference in reactivity and in the reaction product is an indicative of change of the electron transfer-radical addition mechanism to a sequential electron transfer mechanism from the cysteine dianion to the ferrylmyoglobin and metmyoglobin species leading to the formation of oxymyoglobin under alkaline conditions.

Keywords: perferrylmyoglobin, ferrylmyoglobin, hypervalent heme iron, CO, H₂S, L-cysteine, thiol antioxidants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da proteína metamioglobina do coração de cavalo. Figura gerada com auxílio do software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1YMB <i>depositado no Protein Data Bank</i> .	16
Figura 2 - Fragmentação β da estrutura primária da proteína mediada por radicais na presença de oxigênio.	19
Figura 3 - Espécies hipervalentes de ferro heme e seus respectivos espectros de EPR e UV-Vis.	22
Figura 4 - Ciclo da atividade de pseudoperoxidase da mioglobina, onde HA representa qualquer espécie redutora.	23
Figura 5 - Estrutura química da cisteína, glutatona e homocisteína.	24
Figura 6 - Reações envolvendo radicais em proteínas e a atividade antioxidante da glutatona em meio biológico.	25
Figura 7 - Aspectos da ação protetora do H_2S no trato gastrointestinal.	31
Figura 8 - Estrutura cristalográfica do grupo heme da ferrilmioglobina e sulfomioglobina. Figura gerada pelo software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação <i>Protein Data Bank</i> 1GJN para a ferrilmioglobina e 1YMC para a sulfomioglobina ligada à cianeto na posição axial.	32
Figura 9 - Espectro de EPR da reação entre uma solução de metamioglobina e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1, (a) com tempo de envelhecimento de 45 s, (b) tempo de envelhecimento 3 minutos.	35
Figura 10 - Espectro eletrônico de absorção das espécies MbFe(III) na concentração de $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) e sua forma oxidada MbFe(IV)=O (linha vermelha) na concentração de $1,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 0,16.	36
Figura 11 - Espectros de absorção eletrônica correspondentes à formação da sulfomioglobina resultante da reação entre ferrilmioglobina ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e uma solução de H_2S ($\sim 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução aquosa de força iônica $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C em pH 3,1 (A) pH 6,9 (B) e pH 9,0 (C).	38

Figura 12 - Absorção molecular a 616 nm com o tempo para a reação entre ferrilmioglobina ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com sulfeto de hidrogênio ($\sim 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução aquosa de força iônica de $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C para pH 3,0 (A); 6,9 (B); 9,0 (C) com as respectivas curvas de ajuste linear para a obtenção das constantes de pseudo-primeira ordem, k_{obs} . À direita, correlação linear entre k_{obs} e concentração de total de H_2S nos respectivos valores de pH a fim de se obter as constantes de segunda ordem através do coeficiente angular do ajuste linear da reta.	40
Figura 13 - Dependência entre constantes de velocidade de segunda ordem e o pH à 25°C para reação entre ferrilmioglobina e sulfeto de hidrogênio em solução aquosa de força iônica $0,067 \text{ mol L}^{-1}$. A linha foi obtida através da regressão não linear à Equação 5. O ponto de pH = 5,0 não foi considerado.	41
Figura 14 - Relação de Eyring, $\ln(k_2/T)$ versus $(1/T)$, para a constante de velocidade de segunda ordem para a reação entre ferrilmioglobina e sulfeto de hidrogênio em solução aquosa de força iônica $0,067$ a 25°C para pH 7,4 (A), pH 8,0 (B), pH 9,0 (C).	44
Figura 15 - Reação entre triptofano e $^1\text{O}_2$ e arranjo utilizado para preparação fotoquímica do TrpOOH.	51
Figura 16 - Arranjo experimental para aquisição de espectros FT-IR da fase gasosa.	53
Figura 17 - Sistema de freeze-quench e dedo frio contendo N_2 líquido e amostra coletada em sua parte inferior.	55
Figura 18 - Espectros de EPR da $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ durante a redução para MbFe(IV)=O à temperatura de 77 K em tampão fosfato pH 7,4 na presença de CO (A) ou ausência de CO (B). Os espectros foram recordados de amostras com diferentes tempos de envelhecimento. Cada espectro é proveniente de um experimento e o decaimento do radical peroxila ($g=2,036$) e foi normalizado relativo ao decaimento do radical tirosina ($g=2,005$) pela razão entre as áreas dos sinais.	57
Figura 19 - Decaimento referente ao radical $\text{TrpOO}^\bullet$ da espécie reativa perferrilmioglobina em solução aquosa pH 7,4 e 25°C na presença de CO (A) e na ausência de CO (B).	58
Figura 20 - Cubeta de quartzo cilíndrica utilizada para a obtenção dos espectros de FT-IR.	59

Figura 21 - Espéctro FT-IR da fase gasosa em pH 7,4 e 25 °C após 60 minutos de reação e equilíbrio da fase gasosa e líquida. $[MbFe(III)] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[H_2O_2] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[CO] = 7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[TrpOOH] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[Fe(III)TPPS] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.	59
Figura 22 - Separação e caracterização do hidroperóxido <i>trans/cis</i> formado através da adição de oxigênio singlete ao triptofano em D ₂ O saturado com O ₂ com rosa de bengala usado como fotossensibilizador e exposto ao LED de comprimento de onda 532 nm. Os traços em vermelho indicam os pontos de início e final de coleta das bandas cromatográficas P1 (isômero <i>trans</i>) e P2 (isômero <i>cis</i>).	60
Figura 23 - Espectro ¹ H- ¹³ C HSQC do <i>cis</i> -TrpOOH. Condições: Largura espectral de 12019,23 Hz para dimensão F2 (¹ H) e 36057,69 Hz para a dimensão F1(¹³ C). Tempo de aquisição 0,17 s e tempo de relaxação 1s, e 64 varreduras para cada incremento (256 incrementos). A aquisição e processamento de dados foi realizada utilizando-se o programa TopSpin 3,0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany).	61
Figura 24 - Produção de CO ₂ das misturas reacionais mostradas na Figura 21 através da integração do sinal de CO ₂ de 2280 à 2400 cm ⁻¹ .	63
Figura 25 - Constante de pseudo-primeira ordem do processo de auto-redução da espécie ferrilmioglobina em função do pH do meio. Experimentos realizados empregando-se uma solução de MbFe(IV)=O na concentração de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações hidrogeniônicas e força iônica de 0,16.	70
Figura 26 - Espectro de absorção eletrônica da reação entre a espécie MbFe(IV)=O ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a cisteína ($2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). (A) pH 5,6, espectros registrados a cada 1s utilizando a técnica stopped-flow. (B) pH 6,5, espectros coletados a cada 5 s; (C) pH 7,4, espectros coletados a cada 10s; (D) pH 8,2, espectros coletados a cada 10 s.	71
Figura 27 - Espectros eletrônicos de absorção para as espécies MbFe(IV)=O, MbFe(III), e SulfMbFe(II) obtido da reação de redução de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O com $3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H ₂ S em condição de pH = 6,2 e temperatura de 25 °C.	72
Figura 28 - Constantes de primeira ordem em s ⁻¹ para reação	74

MbFe(IV)=O e MbFe(III) com cisteína a 25 °C como função do excesso de cisteína para o pH = 6 (A: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH = 7 (B: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH = 8 (C: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH = 9 (D: $k_4'=\blacksquare$, $k_5'=\bullet$, $k_6'=\blacktriangle$). A qualidade do ajuste não linear foi validada através dos valores residuais; estes valores estão apresentados na Tabela 3.

Figura 29 - Ajustes não lineares utilizando as equações (1) a (3) para os perfis de concentração para a espécie MbFe(IV)=O ($\blacktriangledown$) como reagente e as espécies sulfMbFe(II) ($\blacksquare$) e MbFe(III) ($\blacklozenge$) como produtos na reação de redução da MbFe(IV)=O pela cisteína em meio aquoso com pH = 7 e à temperatura de 25 °C. 75

Figura 30 - (A) Variação da absorbância em 625 nm com o tempo para a formação da espécie sulfMbFe(II) durante a redução de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O em 7,4 a temperatura de 25 °C com o aumento da concentração de cisteína. (B) Dependência linear da constante de velocidade com a concentração de cisteína em condições de pseudo-primeira ordem. (C) Espectros eletrônicos de absorção para as espécies MbFe(IV)=O, MbFe(III), e o espectro eletrônico final obtido da reação de redução de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O com $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína em condição de pH = 6,2 e temperatura de 25 °C; a linha pontilhada indica comprimento de onda de 625 nm. 79

Figura 31 - Constante de segunda ordem do processo de redução da espécie ferrilmioglobina pela cisteína em função do pH do meio à temperatura de 25 °C. A curva foi obtida através do ajuste não linear à Equação 9 com $r^2 = 0,9658$ 81

Figura 32 - Estrutura cristalográfica da proteína metamioglobina do coração de cavalo. Figura gerada com auxílio do software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1YMB depositado no *Protein Data Bank*. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies redox reativas em meio biológico.	18
Tabela 2 - Deslocamentos químicos para RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos <i>cis</i> - and <i>trans</i> - TrpOOH em D_2O .	62
Tabela 3 - Qualidade do ajuste não linear validado pelo valor residual (%) para as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem k_1 a k_6 para cada concentração de cisteína na reação de redução das espécies MbFe(IV)=O e MbFe(III) à temperatura de 25 °C e diferentes condições de pH. Valor residual total (%) para a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem k_1 a k_3 (pH 6, 7 e 8) e k_4 a k_6 (pH 9) para cada concentração em excesso de cisteína.	76
Tabela 4 - Constantes de velocidade de segunda ordem e valores de entropia e entalpia de ativação para a reação de redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína, homocisteína e glutathione em tampão fosfato com força iônica de 0,16 e pH = 7,4.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•MbFe(IV)=O - perferrilmioglobina

CO - monóxido de carbono

D₂O - Oxido de deutério

EPR - *electron praramagnetic ressonance*

FT-IR - *fourier transform infrared spectroscopy*

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂S - sulfeto de hidrogênio

His - resíduo de aminoácido histidina

MbFe(III) - metamioglobina

MbFe(IV)=O - ferrilmioglobina

NOS - *nitrogen reactive species*

RMN - ressonância magnética nuclear

ROS - *reactive oxygen species*

SulfMbFe(II) - sulfomioglobina reduzida

SulfMbFe(III) - sulfomioglobina oxidada

Trp - resíduo de aminoácido triptofano

TrpOO• - radical triptofano peroxila

TrpOOH - triptofano hidroperóxido

Tyr - resíduo de aminoácido tirosina

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Estresse oxidativo e formação de espécies reativas em meio biológico	17
1.2. Oxidação de proteínas por ROS	18
1.3. Aspectos históricos da reatividade da metamioglobina com o peróxido de hidrogênio.	20
1.4. Espécies hipervalentes de ferro heme em meio biológico	21
1.5. Mecanismo e atividade de pseudoperoxidase da Mioglobina	23
1.6. Aminoácidos sulfurados e o estresse oxidativo	24
1.7. Moléculas diatômicas de interesse biológico (NO, H ₂ S e CO)	26
2. Objetivos gerais e específicos	28
3. CAPÍTULO I	29
3. 1. Introdução	30
3. 1.1. Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S)	30
3.2. Materiais e Métodos	33
3.2.1. Formação da Espécie Reativa Ferrilmioglobina	33
3.2.2. Cinética de Formação de sulfomioglobina a partir de H ₂ S	33
3.3. Resultados e Discussão	34
3.3.1. Estudos da Reatividade da ferrilmioglobina com H ₂ S	36
3.4 Conclusões	47
4. CAPÍTULO II	48
4.1. Introdução	49
4.1.1 Monóxido de Carbono (CO)	49
4.2. Materiais e métodos	50
4.2.1. Preparação e isolamento do TrpOOH	50
4.2.2. Caracterização do TrpOOH por espectroscopia de RMN	52
4.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)	52
4.2.4. Espectroscopia Freeze-Quench/EPR	54
4.3. Resultados e Discussão	56
4.3.1. Oxidação de CO mediada pela Perferrilmioglobina	56
4.4. Conclusões	65
5. CAPÍTULO III	66

5.1. Introdução	67
5.2. Materiais e Métodos	68
5.2.1. Experimento cinético de redução da MbFe(IV)=O pela cisteína	68
5.3. Resultados e Discussão	69
5.4. Conclusões	86
6. Conclusões Gerais	88
Referências Bibliográficas	91
Apêndice	100

1. Introdução

1. Introdução

A carne *in natura*, bem como os produtos cárneos, tem grande importância na economia brasileira e está entre os seis principais produtos agrícolas com maior volume de exportação, chegando a um total estimado de 1.183.246 toneladas no ano de 2013.¹ Desta forma, a preocupação com a qualidade sensorial e com a segurança alimentar de produtos cárneos é crescente no Brasil e no mundo. Neste tocante estudo dos processos químicos e bioquímicos que influenciam a qualidade dos produtos cárneos é de grande relevância do ponto de vista tecnológico, comercial, e de saúde pública.

A oxidação de lipídeos e proteínas é apontada como uma das principais causas da perda de qualidade da carne durante seu armazenamento, originando em alterações no produto como a perda da capacidade de retenção de água², alteração na coloração³ e na perda da qualidade de aroma e sabor.⁴

A mioglobina é o componente proteico majoritário do sarcoplasma do tecido muscular, tendo como principal função biológica suprir a demanda mitocondrial de oxigênio no músculo. A mioglobina apresenta um grupo prostético constituído por uma molécula de protoporfirina IX contendo o íon de ferro coordenado no plano equatorial aos grupos pirrólicos do anel porfirínico e no sítio axial coordenado ao aminoácido His93 da cadeia polipeptídica que no caso da mioglobina do coração e músculo esquelético de cavalo possui 153 aminoácidos ($M_r = 17,641$ Da), Figura 1.⁵

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da proteína metamioglobina do coração de cavalo. Figura gerada com auxílio do software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1YMB depositado no *Protein Data Bank*⁵.

Fonte: EVANS, S.V., BRAYER, G.D. High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v. 213, p. 885-897, 1996.

Em produtos cárneos, a mioglobina é o principal pigmento responsável pela coloração avermelhada do produto.² A cor da carne “fresca” está intimamente relacionada à presença da molécula de oxigênio ligada ao íon complexo de ferro heme, bem como ao seu estado de oxidação, Esquema 1.

Esquema 1 - Ciclo da cor da carne “fresca”.

1.1. Estresse oxidativo e a formação de espécies reativas em meio biológico

A condição de estresse oxidativo está relacionada com a incapacidade do maquinário celular em estabelecer o equilíbrio entre a formação e a desativação de espécies oxidantes reativas formadas durante o metabolismo normal da célula. O desbalanço redox está envolvido na origem de diversas doenças degenerativas tais como o câncer, doenças coronárias, e a degeneração macular.^{6,7,8,9}

As principais espécies oxidantes reativas em meio biológico podem ser de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) podendo estas ser ou não espécies radicalares. A cadeia de transporte de elétrons é o principal meio de produção de ROS em células de mamíferos; onde a molécula de oxigênio sofre redução via um elétron produzindo o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O íon superóxido é então convertido enzimaticamente pela ação da superóxido dismutase (SOD) à H_2O_2 que é a espécie reativa de oxigênio mais abundante em meio biológico (concentração *in vivo* de 10^{-7} mol L⁻¹).¹⁰ A espécie $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 são altamente seletivos quanto à sua reatividade em meio biológico, no entanto quando na presença de íons de metais de transição, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila, $HO^{\bullet}$, que é um oxidante muito potente ($E = 2,31$ V vs. NHE) e possui alta reatividade e baixa seletividade. As principais espécies reativas em meio biológicos são ilustradas na Tabela 1.^{11,12}

Tabela 1 - Espécies redox reativas em meio biológico

	E (V vs. NHE)
Oxigênio, O ₂	O ₂ /O ₂ ^{•-} (-0,16)
	O ₂ /HO ₂ ^{•-} (-0,46)
Superoxido, O ₂ ^{•-}	O ₂ ^{•-} , 2H ⁺ /H ₂ O ₂ (0,94)
Hidroperoxila, HO ₂ ^{•-}	HO ₂ ^{•-} , H ⁺ /H ₂ O ₂ (1,06)
Hidroxila, HO [•]	HO [•] , H ⁺ /H ₂ O (2,31)
Peroxila, RO ₂ [•]	RO ₂ [•] , H ⁺ /ROOH (1,0)
Alcoxila, RO [•]	RO [•] , H ⁺ /ROH (1,60)
Carbonato, CO ₃ ^{•-}	CO ₃ ^{•-} , H ⁺ /HCO ₃ ⁻ (1,78)
Dióxido de Carbono, CO ₂ ^{•-}	CO ₂ /CO ₂ ^{•-} (-1,80)
Peróxido de Hidrogênio, H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ , H ⁺ /H ₂ O, HO [•] (0,32)
Tiil, RS [•] (cisteína)	RS [•] /RS ⁻ (0,92)
Dissulfeto, RSSR ^{•-}	RSSR/RSSR ^{•-} (-1,50)
Glutationa, GS [•]	GS [•] /GS ⁻ (0,92)
Óxido Nítrico, NO	NO/ ³ NO ⁻ (-0,76)
Dióxido de Nitrogênio, NO ₂ [•]	NO ₂ [•] /NO ₂ ⁻ (0,99)
Peroxinirito, ONOO ⁻	ONOO ⁻ /NO ₂ [•] (1,6)
Ferro, Fe(III)	Fe(III)/Fe(II) (0,11)

1.2. Oxidação de proteínas por ROS

As proteínas, principalmente em carne, são um importante alvo das espécies oxidantes e reativas em meio biológico. A oxidação por estas espécies pode resultar em danos reversíveis ou irreversíveis a biomoléculas e estruturas sensíveis. As modificações irreversíveis podem induzir o rompimento da estrutura primária da proteína bem como proporcionar alterações das cadeias laterais dos aminoácidos ocasionando perda da estrutura secundária, terciária e quaternária.¹³

Os aminoácidos mais susceptíveis à modificação oxidativa (triptofano, tirosina, histidina, metionina, cisteína, e arginina), são aqueles que apresentam cadeia lateral com maior densidade eletrônica e são sítios de formação de radicais relativamente estáveis, com tempo de vida na ordem de milisegundos. A fragmentação da estrutura primária é identificada frequentemente em aminoácidos que possibilitam a transferência de elétrons ou a abstração de átomo de hidrogênio do carbono- α . A fragmentação da cadeia é conduzida pela cisão em β do radical alcóxila formado em C-3 na cadeia lateral do aminoácido oxidado,¹⁴ (Figura 2).

Figura 2 - Fragmentação β da estrutura primária da proteína mediada por radicais na presença de oxigênio.

Os radicais formados na cadeia polipeptídica podem ser transferidos entre as cadeias laterais dos aminoácidos principalmente aqueles que possuem função aromática como a tirosina e o triptofano.¹⁵

Os radicais peróxila são formados prontamente quando radicais centrados no carbono são expostos ao oxigênio molecular.¹⁶ O radical peróxila derivado do aminoácido triptofano ($\text{TrpOO}^\bullet$) é formado na cadeia polipeptídica de heme proteínas

como a metamioglobina através da ativação do grupo heme coordenado com H_2O_2 e sua presença tem sido reportada em diversos trabalhos.^{17,18,19,20}

1.3. Aspectos históricos da reatividade da metamioglobina com o peróxido de hidrogênio.

A reação entre uma heme proteína e o peróxido de hidrogênio foi primeiramente descrita por Rudolf Koberg em 1900, que notou a mudança de coloração de marrom para vermelho de uma solução de metahemoglobina (metHb) quando à esta adicionava-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta mudança no espectro de absorção foi atribuída à complexação do peróxido de hidrogênio à metHb e a este novo complexo Koberg deu o nome de *Wasserstoffsuperoxydmethämoglobin* que em alemão significa metamioglobina peróxido de hidrogênio.²⁰ Cerca de trinta anos mais tarde Keilin e Hartree mostraram que o complexo H_2O_2 -metHb era formado por um mecanismo similar ao de outros ligantes tais como H_2S , CN^- e N_3^- , no entanto este complexo exibia a peculiaridade de ser reduzido por ferrocianeto regenerando a espécie metHb.²¹ Baseando-se nestes resultados George e Irvine utilizando uma outra heme proteína, a metamioglobina (MbFe(III)), identificaram que as mudanças espectrais estavam relacionadas à oxidação do átomo de ferro ao estado de oxidação 4+ (ferrilmioglobina), contrariando assim a hipótese da formação de um complexo H_2O_2 -metMb.^{22,23} Considerando o fato de que o peróxido de hidrogênio é um oxidante via dois elétrons, George e Irvine propuseram a formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) devido à um “flash” detectado quando a reação era realizada na presença de luminol.

O estabelecimento da técnica de EPR (*electron paramagnetic resonance*) possibilitou o estudo das espécies radicalares formadas neste meio reacional. Em um primeiro momento, o radical detectado foi atribuído à formação de um radical π -cátion no anel de porfirina.²⁴ No entanto, esta hipótese foi abandonada quando se observou a disparidade quantitativa entre a formação do radical e a espécie opticamente ativa. Assim considerou-se que o radical detectado não estaria centrado no sistema porfirina-metal e sim na cadeia de aminoácidos da proteína.²⁵

A negação completa da formação de um complexo e um estudo concreto do mecanismo de reação entre a MbFe(III) e H_2O_2 se deu com a publicação dos trabalhos de Kelso King e Winfeld^{26,27} que acompanharam a formação e o decaimento do radical, concluindo que o processo envolvia a oxidação da espécie metMb através de dois elétrons oxidando o centro metálico de ferro(III) passando por um estado intermediário radicalar centrado em um aminoácido na cadeia polipeptídica. O aminoácido tirosina foi considerado devido à comparação do espectro de EPR da reação com o resultante da irradiação com radiação luminosa na região do UV de vários aminoácidos livres na presença de H_2O_2 . Outro dado importante foi à identificação do consumo de O_2 pelo sistema que levou à possibilidade da formação de alguma espécie radicalar oxigenada.

Mais recentemente os estudos de EPR aliados às técnicas de biologia molecular demonstraram que as estruturas primárias bem como o arranjo espacial destes aminoácidos possuem influência crucial no processo de transferência de elétrons intramolecular. Assim, os radicais formados em mioglobinas advindas de diferentes organismos ou com sua sequência de aminoácidos modificada artificialmente apresentam mecanismos de auto-redução distintos que podem levar ao processo de *cross-link* entre as cadeias polipeptídicas da proteína bem como alterações na própria cinética de auto-redução e de formação dos radicais.^{28,29}

1.4. Espécies hipervalentes de ferro heme em meio biológico

Pigmentos hipervalentes de ferro heme são formados durante o estresse oxidativo em tecido muscular e fluídos biológicos tais como o sangue e o músculo esquelético através da ativação de heme-proteínas ou peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos.^{17,18} Inicialmente, nesta reação, são formados os intermediários perferrilmioglobina, aqui denominados de Composto I, que apresentam o íon complexo de ferro(IV) na forma de um cátion radical centrado no anel porfirínico. O composto I em condições fisiológicas e na ausência de redutor sofre processo de auto-redução promovendo a formação de espécies hipervalentes de ferro heme, ferro(IV), que apresentam um longo tempo de vida (tempo de meia vida de horas). Estas espécies hipervalentes de ferro heme são denominadas de Composto II, como por exemplo, a ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O)

resultante da reação do pigmento da carne mioglobina com o peróxido de hidrogênio.^{30,31} As espécies hipervalentes de ferro heme podem então reagir com proteínas ou estruturas sensíveis à oxidação ocasionando lesões oxidativas a biomoléculas. A oxidação de proteínas miofibrilares em carne, tais como a miosina, por meio da reação com espécies hipervalentes de ferro heme formando radical tiila e tirosila na cadeia lateral da proteína promovendo o *cross-link* das cadeias polipeptídicas impacta diretamente nas propriedades sensoriais e nutricionais do produto.³²

O estudo das espécies heme hipervalentes é realizado com o auxílio das técnicas de absorção molecular, UV-Vis e ressonância paramagnética eletrônica (EPR) como ilustrado na Figura 3. Os espectros de absorção das espécies ferrilmioglobina e perferrilmioglobina são idênticos, sendo assim a técnica de EPR essencial para o estudo do radical formado na espécie perferrilmioglobina.

Figura 3 - Espécies hipervalentes de ferro heme e seus respectivos espectros de EPR e UV-Vis.

1.5. Mecanismo e atividade de pseudoperoxidase da Mioglobina

A Figura 4 ilustra o mecanismo de atividade de pseudoperoxidase da mioglobina quando esta é ativada pela reação com peróxido de hidrogênio e/ou hidroperóxidos. Inicialmente a proteína metamioglobina (MbFe(III)) na presença de peróxido de hidrogênio é oxidada via dois elétrons levando à formação do cátion radical perferrilmioglobina (MbFe(IV)=O^+) que rapidamente decai ao radical perferrilmioglobina ($\bullet\text{MbFe(IV)=O}$) o qual sofre processo de auto-redução ou então pode ser reduzido por uma molécula de proteína ou lipídeo formando a espécie reativa ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O). A MbFe(IV)=O por sua vez reage com uma segunda molécula redutora e é convertida à espécie inicial MbFe(III) .³³ Vale lembrar que ambas reações de redução dos estados hipervalentes de ferro heme podem ocorrer, lentamente, por um processo de auto-redução pela oxidação de aminoácidos da cadeia lateral da proteína.

Figura 4 - Ciclo da atividade de pseudoperoxidase da mioglobina, onde HA representa qualquer espécie redutora.

Metabólitos endógenos tais como o NADH ou aditivos como polifenóis do maté podem proteger o tecido muscular ou a carne dos efeitos deletérios das

espécies hipervalentes de ferro heme, uma vez que promovem a desativação destes compostos por redução, atuando como antioxidantes pela competição na desativação da $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ e MbFe(IV)=O ,³⁴ podendo evitar modificações post-transdacionais na cadeia polipeptídica de proteínas ou então protegendo estruturas sensíveis à oxidação.³⁵

1.6. Aminoácidos sulfurados e o estresse oxidativo

A produção controlada de ROS para a manutenção da atividade celular envolve uma complexa rede de mecanismos e reações redox de sinalização.³⁶ Um importante componente destas reações são as substâncias contendo a função tiol (RSH) tais como a cisteína, homocisteína e a glutathiona, cujas as estruturas químicas são apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química da cisteína, glutathiona e homocisteína

A cisteína que pode ser encontrada em diversos estados de oxidação como dissulfetos (RSSR) ou como ácidos sulfênico (SOH), Sulfínico (SO₂H) ou sulfônico

(SO₃H). Além disto formação de ligações de dissulfeto permitem à cisteína o envolvimento em fatores estruturais em proteínas. O baixo potencial redox dos tióis em proteínas ($E = -0,27$ à $-0,125$ V vs. NHE) é um importante aspecto para o envolvimento em reações redox dos aminoácidos sulfurados em meio biológico.³⁷

O grupo tiol é análogo ao grupo álcool, no entanto a diferença de eletronegatividade do átomo de enxofre torna este grupo menos polar e também mais ácido, pK_a ao redor de 8,2 na cadeia polipeptídica.³⁸ A cisteína possui alta dependência quanto ao seu micro ambiente, dentre estes podemos citar o peptídeo glutathiona, maior fonte de tiol contida no organismo, em que o pK_a do grupo tiol é 9,42.^{38,39}

A glutathiona (GSH) é um peptídeo constituído por três aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína e glicina) e pode ser encontrada em equilíbrio com a sua forma oxidada (GSSG). A sua concentração celular pode variar entre 0,5-10 mmol L⁻¹, no plasma pode chegar a concentrações de micromolar.⁴⁰ A glutathiona juntamente com o ascorbato (vitamina C) são reconhecidos como antioxidantes endógenos de baixa massa molecular. A falta de capacidade de sua reposição em condições de estresse oxidativo é um dos mecanismos que podem levar a danos irreversíveis à proteínas e iniciar a peroxidação lipídica, Figura 6.¹³

Figura 6 - Reações envolvendo radicais em proteínas e a atividade antioxidante da glutathiona em meio biológico.

Fonte: adaptado de Gebicki et al.¹³

1.7. Moléculas diatômicas de interesse biológico (NO, H₂S e CO)

O estudo da interação de pequenas moléculas com função na regulação celular tais como o óxido nítrico (NO), o sulfeto de hidrogênio (H₂S) e o monóxido de carbono (CO) tornou-se uma importante área de estudos em processos redox em meio biológico. Uma vez que estes gases transmissores podem também exibir importante função na desativação dos pigmentos heme hipervalentes em produtos cárneos e no sistema biológico.⁴¹ A reação entre o óxido nítrico e a espécie hipervalentes de ferro heme é bem reportada e foi descrita como de elevada importância no controle da oxidação em sistemas cárneos e meio biológico. No entanto, a reação de desativação de compostos hipervalentes de ferro-heme por sulfeto de hidrogênio ou monóxido de carbono ainda não é bem compreendida e investigada.^{42,43}

2. Objetivos Gerais

Objetivos Gerais

2. Objetivos Gerais

Em linhas gerais o objetivo da presente Tese de doutorado foi o de propiciar um melhor conhecimento da reatividade das espécies de ferro-heme hipervalente frente a conhecidos redutores biológicos contendo a função tiol e frente a pequenas moléculas diatômicas reconhecidas como sinalizadores celulares (CO e H₂S). O conhecimento da cinética e do mecanismo destas reações redox proporcionará o entendimento dos principais caminhos de reação envolvidos na deterioração da carne e do estresse oxidativo no trato gastrointestinal induzido pelo pigmento da carne vermelha. Este entendimento possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias antioxidantes voltadas a qualidade da carne e a saúde do consumidor.

Objetivos específicos:

- Investigar a cinética e mecanismo de redução da espécie ferrilmioglobina pelo sulfeto de hidrogênio em diferentes concentrações hidrogênionicas do meio reacional simulando diversas condições no trato gastrointestinal e em produtos cárneos;
- Investigar a cinética e mecanismo de redução das espécies perferrilmioglobina e ferrilmioglobina pelo monóxido carbono em condições mimetizando a digestão no trato gastrointestinal e produtos cárneos;
- Investigar a cinética e mecanismo de redução da espécie ferrilmioglobina pela cisteína, homocisteína e glutatona e o efeito da concentração hidrogênionica do meio reacional mimetizando condições de digestão no trato gastrointestinal e em produtos cárneos.

3. CAPÍTULO I - Redução da Ferrilmioglobina por H₂S.

3. 1. Introdução

3. 1.1. Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

A investigação da reatividade entre moléculas endógenas como o H₂S e pigmentos de ferro hipervalentes tem sua importância no entendimento tanto de reações no organismo vivo quanto na química de conservação da carne embalada. O processo de *greening* da carne é formado em carne embalada juntamente com condimentos como o alho, ocasionando o esverdeamento do produto mesmo que em condições de baixa temperatura.^{44,45,46}

A função de sinalização celular apresentada pelo H₂S no organismo vem sendo discutida uma vez que este pode ser encontrado em baixas concentrações em tecidos como o cérebro 17 nmol L⁻¹⁴⁷ e em altas concentrações no trato gastrointestinal chegando ao teor de 3,4 mmol kg⁻¹ onde sua formação é atribuída ao metabolismo de redução do íon sulfato produzido por algumas bactérias anaeróbias e tem sua concentração modulada pela dieta e pelo microbioma.^{48,49} O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a altas concentrações de pró-oxidantes, como por exemplo, espécies de ferro heme (mioglobina) especialmente em dietas ricas em proteína animal. Quantidades elevadas de H₂O₂ e ROOH (podendo chegar a concentrações superiores a 100 µmol L⁻¹) podem ser encontradas em algumas bebidas como chás e café e em alimentos ricos em lipídeos e parcialmente oxidados. A combinação da dieta rica em mioglobina com a presença de peróxidos e hidroperóxidos da dieta são considerados um dos principais promotores e responsáveis pelo câncer de cólon de intestino e estômago. Assim, a investigação da atividade antioxidante apresentado pelo H₂S frente à espécie hipervalentes de ferro heme tem sua importância na proteção antioxidante do trato gastrointestinal contra o processo de tumorigênese, Figura 7.^{50,51}

Figura 7 - Aspectos da ação protetora do H_2S no trato-gastrointestinal.

O pigmento verde resultante da reação entre a proteína metamioglobina e H_2S vem sendo denominado como sulfomioglobina. Parâmetros físico-químicos de sulfoheme proteínas têm sido reportados em diversos trabalhos,^{52,53,54,55,56} no entanto o mecanismo para sua formação bem como as constantes de velocidade envolvidas no processo ainda está sendo discutida devido à existência de inúmeras reações paralelas e condições adversas deste sistema.

As sulfoheme proteínas são uma classe de proteínas formadas por reações análogas de protoheme proteínas com H_2S . A primeira protoheme proteína resultante das reações com H_2S estudada foi a sulfohemoglobina no ano de 1866 por Hoppe-Seyler como resultado do pigmento verde da reação da HbO_2 (oxihemoglobina) e H_2S ao qual deu o nome, na língua alemã, de “Schwefelmethämoglobin”.⁵³

Estudos realizados por Keilin 1933 determinaram a dependência da formação do composto sulfohemoglobina com o oxigênio molecular propondo que o átomo de

enxofre não estava diretamente coordenado ao centro metálico. Esta afirmação baseia-se no fato que o íon de ferro encontra-se no estado de oxidação 2+ e a banda centrada em 618 nm no espectro eletrônico de absorção é característica da formação do pigmento verde.⁵⁷

Em 1961 Nicholls preparou a sulfomioglobina a partir da espécie $MbFe(IV)=O$ determinando que o centro metálico era reduzido à íon complexo de $Fe(II)$ devido à semelhança dos coeficientes de absortividade molar entre as espécies carboximioglobina e carboxisulfomioglobina. Determinou também que a sulfomioglobina não possui afinidade por oxigênio molecular e não possui enxofre ligado à sexta posição da esfera de coordenação do metal.⁵² Assim em 1967 Morell identificou que o grupo cromóforo responsável pelo máximo em 617 nm como sendo a adição de um átomo de enxofre à ligação β - β do anel da protoporfirina, Figura 8.⁵⁸

Figura 8 - Estrutura cristalográfica do grupo heme da ferrimioglobina⁵ e sulfomioglobina.⁵⁸ Figura gerada pelo software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação *Protein Data Bank* 1GJN para a ferrimioglobina e 1YMC para a sulfomioglobina ligada à cianeto na posição axial.

3.2. Materiais e Métodos

Acetato de zinco (97%), catalase de fígado bovino ($\geq 90\%$), cloreto de ferro (III) (97%), mioglobina cardíaca de equino ($\geq 90\%$), n,n-dimetil-p-fenilenodiamina (97%), peróxido de hidrogênio 30% v/v, sulfeto de ferro (II) (97%), sulfeto de sódio ($\geq 98\%$), foram obtidos da Sigma-Aldrich (Stenheim, Alemanha). A mioglobina foi purificada utilizando-se método previamente descrito na literatura.⁵⁹ K_2HPO_4 e KH_2PO_4 foram de grau analítico e obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ), ácido bórico, ácido fosfórico e bórax foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido acético da AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha). Ácido clorídrico 37% foi obtido da VWR international (Leuven, Belgica). A água deionizada foi obtida em um sistema de tratamento via osmose reversa seguido de purificação em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, USA).

3.2.1. Formação da Espécie Reativa Ferrilmioglobina

A espécie reativa ferrilmioglobina foi preparada através da reação entre uma solução de metamioglobina de concentração apropriada com peróxido de hidrogênio em duas vezes de excesso molar com relação à concentração de mioglobina. Após 3 minutos de reação, o excesso de H_2O_2 foi removido através da adição de 13 μL de uma solução de catalase (9.4 mg /mL) em 1 mL da solução reacional. A solução de ferrilmioglobina foi mantida por 5 minutos à temperatura ambiente para assegurar total consumo do peróxido de hidrogênio.⁶⁰

3.2.2. Cinética de Formação de sulfomioglobina a partir de H_2S

O sulfeto de hidrogênio foi gerado adicionando-se 3 mL de uma solução de ácido clorídrico 2,5 mol L^{-1} a 0,4 g de sulfeto de ferro (II). O sistema de produção de gás foi conectado a um segundo tubo, de lavagem, contendo solução de ácido clorídrico 2,5 mol L^{-1} , o gás proveniente do frasco de lavagem foi borbulhado em 200 μL de uma solução tampão com o pH desejado e a força iônica de 0,067 durante 12 minutos. Ao interromper-se o fluxo de H_2S foram adicionados imediatamente 3,8 mL da solução tampão obtendo-se uma solução estoque. Alíquotas de (200 - 800 μL)

foram diluídos para um volume final de 5 mL. A concentração de enxofre total foi determinada utilizando-se o do método azul de metileno.^{61,62}

A solução estoque de metamioglobina (45 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi preparada em tampão fosfato pH 7,4 5 mmol L^{-1} para os experimentos em ácido e a solução foi purificada como descrito na literatura.⁵⁹ Para os experimentos cinéticos em pH 6,2; 6,9 e 8,0 utilizou-se uma solução tampão fosfato, enquanto que para os experimentos realizados em pH 9,0 utilizou-se uma solução de tampão bórax. A força iônica final (após a mistura entre as soluções de ferrilmioglobina e H₂S) foi mantida constante em 0,067 mol L^{-1} em todos os experimentos envolvendo o H₂S. Para os experimentos conduzidos em meio ácido (pH 5,5; 5,0; 4,2 e 3,1) em tampão fosfato ou acetato, utilizou-se a técnica de *pH-jump* na qual a mistura de dois tampões de pH distintos atinge o pH desejado ao misturar-se na câmara de reação do sistema de injeção de amostra por parada de fluxo (*stopped-flow*). Desta forma foi possível manter a concentração final de ferrilmioglobina em 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparada da reação de metamioglobina previamente purificada e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:2 adicionando-se catalase após 2 minutos para remover excesso peróxido de hidrogênio ou formado durante a reação com o H₂S.

A formação da sulfomioglobina foi acompanhada espectrofotometricamente com o auxílio de um sistema de mistura rápida e sequencial com injeção de amostra por parada de fluxo (*stopped-flow*) *Applied Photophysics* SX20 acoplado a um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200 – 800 nm em diferentes intervalos de tempo dependendo da velocidade de reação.

3.3. Resultados e Discussão

A reação entre a metamioglobina e o peróxido de hidrogênio, tem como primeiro intermediário a espécie chamada peroximioglobina (composto 0), identificada por espectroscopia de raio-X com tempo vida muito curto⁶³ levando a formação do composto I, perferrilmioglobina, com tempo de vida na ordem de segundos à temperatura ambiente, podendo assim ser caracterizado pela técnica de EPR à 77 K. A Figura 9 ilustra o espectro de EPR para a espécie perferrilmioglobina

que é formada através da transferência de elétrons dos aminoácidos (Tyr64)^{64,71} e (Trp14)^{19,65} da cadeia lateral da proteína para o π -cátion radical no anel porfirínico.

Figura 9 - Espectro de EPR da reação entre uma solução de metamioglobina e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1, (a) com tempo de envelhecimento de 45 s, (b) tempo de envelhecimento 3 minutos.

A espécie formada pela redução da perferrilmioglobina, ferrilmioglobina, apresenta tempo de vida de horas, podendo assim a sua reatividade ser investigada por espectroscopia de absorção na região do visível (Figura 10) sem a interferência da espécie perferrilmioglobina.

Figura 10 - Espectro eletrônico de absorção das espécies MbFe(III) na concentração de $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) e sua forma oxidada MbFe(IV)=O (linha vermelha) na concentração de $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,4 e força iônica de 0,16.

3.3.1. Estudos da Reatividade da ferrimioglobina com H_2S

A reação foi acompanhada espectrofotometricamente na região do visível onde se observa o decaimento da banda centrada em 580 nm, comprimento de onda de absorção característico da MbFe(IV)=O⁵⁹ ao passo que uma banda em 616 nm é formada. Esta absorção em 616 nm tem sido atribuída como característica para o pigmento verde sulfomioglobina.⁴³ Para todos os valores de pH a reação demonstrou seguir a cinética de pseudo-primeira ordem com excesso de H_2S ($10^{-4} < C_{H_2S} < 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em relação à concentração de MbFe(IV)=O em torno de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

O intervalo de tempo observado para as reações foi abaixo de um segundo e quando mais lenta, dependendo das condições, completava-se em poucos segundos. Assim para registrar os espectros em tempo hábil utilizou-se a técnica de injeção de amostra por parada de fluxo (*stopped-flow*) em todos os experimentos. Assim duas soluções foram preparadas previamente, uma contendo H_2S em tampão de pH adequado para cada experimento, e outra de MbFe(IV)=O que após a rápida mistura permitiu o registro dos espectros em determinados intervalos de tempo (Esquema 2).

Esquema 2 - Ilustração do instrumento de stopped-flow.

Através do acompanhamento espectrofotométrico da reação, observa-se claramente pontos isobésticos bem definidos com posições variáveis dependendo do pH do meio reacional como é ilustrado na Figura 11. A clara observação destes pontos isobésticos sugere que não há alteração da estequiometria da reação durante seu curso e que não ocorrem reações paralelas durante a escala de tempo reacional observada.

A origem do produto, sulfomioglobina, ainda está em discussão, pois depende de qual forma da mioglobina está envolvida no processo.^{44,46,66} A reação entre H_2S e compostos hipervalentes de ferro heme demonstra que existe a adição de um átomo de enxofre no anel N-heterocíclico.^{58,67} O espectro do produto encontrado no presente trabalho, está de acordo com as características espectrais da espécie Fe(II) Sulfomioglobina.⁵³

Figura 11 - Espectros de absorção eletrônica correspondentes à formação da sulfomioglobina resultante da reação entre ferrimioglobina ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e uma solução de H_2S ($\sim 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução aquosa de força iônica $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C em pH 3,1 (A) pH 6,9 (B) e pH 9,0 (C).

A dependência do espectro de absorção com a concentração hidrogeniônica do meio está ainda de acordo com a formação do intermediário de ferro(III) contendo uma molécula de água coordenada ao centro metálico, cujo pK_a se encontra em torno de 8, como é descrito para a espécie metamioglobina ($MbFe(III)$).⁶⁸

Com base nas características espectrais, pode-se concluir que o composto formado ao final da reação representada pela Equação 1 é o composto sulfomioglobina com centro metálico de $Fe(II)$ contendo o átomo de enxofre diretamente incorporado ao anel porfirínico de acordo com estudos estruturais baseados em espectroscopia Raman.^{44,45,46} Assim, a etapa determinante da reação é a redução do centro metálico de ferro (IV) à ferro(III) pelo H_2S que antecede as reações mais rápidas que se seguem.

Para as reações em meio ácido, a solução contendo a espécie MbFe(IV)=O teve seu pH ajustado apenas no momento da mistura com a solução de H₂S que foi mantida em outra seringa em ácido antes do registro dos espectros. Este arranjo experimental é chamado de *pH-jump* que foi necessário para diminuir o tempo de exposição da ferrilmioglobina ao ambiente ácido, evitando assim o risco de desnaturação da proteína que ocorre em alguns minutos em meio ácido⁶⁹

As constantes em condições de pseudo-primeira ordem foram determinadas através do ajuste não linear (Figura 12 A-C) utilizando-se a Equação 2:

$$A_{(t)} = A_0 + (\text{Plato} - A_0) \cdot (1 - e^{(-kt)}) \quad (2)$$

Para valores constantes de pH e temperatura foi observada uma dependência linear com a concentração total de sulfeto de hidrogênio, Figura 7A-C.

Figura 12 - Absorção molecular a 616 nm com o tempo para a reação entre ferrimioglobina ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) com sulfeto de hidrogênio ($\sim 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução aquosa de força iônica de $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C para pH 3,0 (A); 6,9 (B); 9,0 (C) com as respectivas curvas de ajuste linear para a obtenção das constantes de pseudo-primeira ordem, k_{obs} . A direita, correlação linear entre k_{obs} e concentração de total de H_2S nos respectivos valores de pH a fim de se obter as constantes de segunda ordem através do coeficiente angular do ajuste linear da reta.

A relação entre k_{obs} e a concentração total de sulfeto de hidrogênio permitiu a determinação da constante de velocidade de segunda ordem (k_2) que foi obtida pelo ajuste linear da equação da reta aos pontos experimentais.

Os valores das constantes de velocidade em diferentes condições de pH apresentaram comportamento não linear e estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Dependência entre constantes de velocidade de segunda ordem e o pH à 25 °C para reação entre ferrilmioglobina e sulfeto de hidrogênio em solução aquosa de força iônica $0,067 \text{ mol L}^{-1}$. A linha foi obtida através da regressão não linear à Equação 5. O ponto de $\text{pH}=5,0$ não foi considerado.

O comportamento dependente dos valores da constante de velocidade específica com a concentração hidrogênioica do meio pode ser atribuído a existência de dois equilíbrios ácido-base conforme ilustrado no Esquema 3.

Esquema 3. Reações envolvidas na formação de sulfomioglobina resultante da reação entre ferrilmioglobina e sulfeto de hidrogênio em pH da carne.

Para o equilíbrio ácido/base envolvendo o sulfeto de hidrogênio temos:

O valor de pK_a para o H₂S é 6,8 a 25 °C e depende da temperatura com parâmetros termodinâmicos de $\Delta H^{\circ} = 22 \text{ kJ mol}^{-1}$ $\Delta S^{\circ} = -58 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.⁷⁰ O outro equilíbrio ácido-base a ser considerado é a protonação da ferrilmioglobina o qual afeta diretamente a redução do metal para ferro(III):

correspondendo ao pK_a de 4,9 a 25 °C.³⁴

Considerando-se as quatro possíveis reações envolvendo as duas formas ácido-base das duas espécies reacionais, a seguinte relação entre k₂ e pH é deduzida para a temperatura constante, Equação 5.⁷¹

$$k_2 = \frac{1}{([H^{+}] + K_a^{H_2S}) \times ([H^{+}] + K_a^{MbFe(IV)=O, H^{+}})} \times [k_{H_2S, MbFe(IV)=O, H^{+}} \times [H^{+}]^2 + (k_{H_2S, MbFe(IV)=O} \times K_a^{MbFe(IV)=O, H^{+}} + k_{HS^{-}, MbFe(IV)=O, H^{+}} \times K_a^{H_2S}) \times [H^{+}] + k_{HS^{-}, MbFe(IV)=O} \times K_a^{H_2S} \times K_a^{MbFe(IV)=O, H^{+}}] \quad (5)$$

Para a temperatura de 25 °C e o pK_a de 6,8 e 4,9 para as espécies sulfeto de hidrogênio e ferrilmioglobina, respectivamente, foram calculados os valores de k₂ em função do pH de acordo com a Equação 5.

O valor obtido de $k_{H_2S, MbFe(IV)=O, H^{+}} = (2,50 \pm 0,14) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foi calculado para a reação dominante em meio ácido (Equação 6). A reação dominante em meio alcalino, mais lenta, apresentou $k_{HS^{-}, MbFe(IV)=O} = (1,0 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Equação 7).

Para o valor de pH intermediário, pH relevante para a carne, o valor de $k_{H_2S, MbFe(IV)=O} \cdot K_a^{MbFe(IV)=O} + k_{HS^{-}, MbFe(IV)=O, H^{+}} \cdot K_a^{H_2S} = (5,0 \pm 0,8)$ foi obtido. Isto pode ser atribuído a similaridade do estado de transição para as reações 7 e 8 {MbFe(IV)=O...H...SH}[‡]. Esta singularidade é chamada de “ambiguidade prótica”

que não pode ser resolvido utilizando-se as equações (8) e (9) separadamente ou com base apenas nos dados experimentais obtidos no presente trabalho.

Um valor aproximado das constantes pode então ser calculado assumindo-se as duas equações independentes. Assim, obteve-se o valor de $k_{\text{HS}^-, \text{MbFe(IV)=O, H}^+} = (3,2 \pm 0,5) \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ admitindo-se que a reação da Equação (8) é predominante, enquanto que o valor de $k_{\text{H}_2\text{S, MbFe(IV)=O}} = (4,0 \pm 0,7) \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ é obtido assumindo-se a reação da Equação (9) majoritária.

Considerando-se os valores numéricos à temperatura 25 °C e força iônica de 0,067, podemos ordenar as constantes de velocidade como: $k_{\text{H}_2\text{S, MbFe(IV)=O, H}^+} = (2,5 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1} > k_{\text{H}_2\text{S, MbFe(IV)=O}} = (4,0 \pm 0,7) \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1} > k_{\text{HS}^-, \text{MbFe(IV)=O}} = (1,0 \pm 0,7) \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Desta forma a reação com maior importância no pH da carne seria a reação representada pela Equação 9.

A catálise ácida é relevante para a reação da MbFe(IV)=O como oxidante, e a Equação 9 segue um mecanismo similar ao observado para outros redutores.^{34,17} Desta maneira, sugere-se que o H₂S como reagente de redução transfere um próton para a espécie MbFe(IV)=O antes da transferência de elétrons, processo conhecido como *proton coupled electron transfer (PCET)*.⁷² O mecanismo no qual a reação da Equação 9 é predominante sobre a Equação 8 está, além disso, de acordo com um mecanismo operando por catálise ácido-base ao invés de uma catálise ácida específica. A protonação da MbFe(IV)=O como exemplificado na reação da Equação 8 depende apenas do pH fornecendo a evidência de que a reação da Equação 9 é a dominante.

A dependência da redução da MbFe(IV)=O pelo o H₂S com a temperatura também é dependente do pH. Para a reação mais lenta em valores de pH maiores, a redução teve dependência com a temperatura, a qual, entretanto, torna-se pequena com a diminuição do pH do meio como pode ser verificado na Figura 14.

Figura 14 - Relação de Eyring, $\ln(k_2/T)$ versus $(1/T)$, para a constante de velocidade de segunda ordem para a reação entre ferrimioglobina e sulfeto de hidrogênio em solução aquosa de força iônica 0,067 para pH 7,4 (A), pH 8,0 (B), pH 9,0 (C).

Os parâmetros de ativação obtidos para a reação em meio alcalino, pH 9, ($\Delta H^\ddagger = (19 \pm 2) \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = (-113 \pm 7) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) se aplicam à reação da Equação 7. Enquanto, para as reações em condições neutras à ligeiramente ácidas, os parâmetros de ativação são quantidades que dependem simultaneamente das reações representadas pelas Equações 6 e 9. Particularmente, para condições de pH da carne, a dependência da temperatura apresentada pela reação entre MbFe(IV)=O e H_2S é praticamente nula. Este tipo de reações com compensação térmica é importante em sistemas biológicos.⁴⁶ Neste caso particular, esta compensação pode ser explicada pela diminuição do valor de pK_a do H_2S ($\Delta H^\circ = 22 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a dissociação ácida) que aumenta a concentração da espécie menos

reativa HS^- as custas da espécie H_2S , mais reativa, com a temperatura. A dependência do pK_a da espécie $MbFe(IV)=O, H^+$ com a temperatura é desconhecida, no entanto é razoável assumir que este processo é endotérmico assim como para o H_2S . Ao considerar que $\Delta H^\circ \approx \Delta G^\circ$ para a reação da Equação 4, o aumento da temperatura leva ao aumento da espécie $MbFe(IV)=O$ as custas da espécie mais reativa $MbFe(IV)=O, H^+$, de forma mais significativa do que para o H_2S . Este fato ocorre uma vez que o ΔH° para a ionização da $MbFe(IV)=O, H^+$ pode ser estimado em 27 kJ mol^{-1} , calculado a partir da dependência do pK_a com a temperatura.³⁴

Assim, o aumento da concentração de ambas as formas menos reativas de ambos os reagentes em função do aumento da temperatura, mantendo-se o pH constante, aparentemente compensaria o aumento na velocidade de reação com um pequeno aumento de 60 kJ mol^{-1} no valor de energia de ativação como foi determinado para a auto redução da espécie $MbFe(IV)=O$.³⁴ Esta compensação da temperatura claramente parece ter importância para o esverdeamento da carne em condições de armazenamento a baixas temperaturas, que ocorre sem diminuição na velocidade de reação quando comparada à temperatura fisiológica.

Para as condições de pH da carne, podemos inferir que o sulfeto de hidrogênio entra na cavidade da $MbFe(IV)=O$ inicialmente transferindo um próton seguido da transferência de um elétron do enxofre para a espécie protonada $MbFe(IV)=O, H^+$ levando à formação do íon complexo de ferro(III). O radical tiila formado na cavidade adiciona-se ao anel porfirínico levando à formação da metasulfomioglobina com o íon de ferro no estado de oxidação 3+ (Esquema 4). Esta última espécie, metasulfomioglobina-Fe(III), subsequentemente é reduzida em uma rápida reação levando à formação do composto verde de ferro (II) sulfomioglobina. A exata natureza dos reagentes e o mecanismo responsável pela rápida transformação da forma ferro (III) da sulfomioglobina para a forma verde sulfomioglobina não foi identificada, mas radicais formados na cadeia lateral da proteína podem estar envolvidos e mais estudos estão sendo realizados no sentido de investigar este mecanismo.

Esquema 4 - Reação dominante em condições de pH da carne para a formação de sulfomioglobina a partir de ferrimioglobina e sulfeto de hidrogênio.

3.4. Conclusões

A espécie hipervalente ferrilmioglobina é eficientemente desativada pelo H₂S/HS⁻ levando à formação da espécie Sulfomioglobina. A reação ocorre com maior constante de velocidade em meio ácido, $k_{\text{H}_2\text{S}, \text{MbFe(IV)=O}, \text{H}^+} = (2,50 \pm 0,14) 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em decorrência da maior reatividade das espécies presentes majoritariamente MbFe(IV)=O, H⁺ e H₂S em condições de pH < 5. Em meio alcalino, pH > 7, onde majoritariamente estão presentes as espécies MbFe(IV)=O e HS⁻ a reação ocorre mais lentamente com constante de velocidade, $k_{\text{HS}^-, \text{MbFe(IV)=O}} = (1,0 \pm 0,7) 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cerca de 2,5 ordem de grandeza inferior a reação em meio ácido. A constante de velocidade da reação de redução da espécie ferrilmioglobina pelo H₂S/HS⁻ possui pouca dependência com a temperatura em condições de pH < 7. Esta reação química com compensação de temperatura, não é usualmente observada, porém é um fator determinante para melhor compreender a ocorrência do processo de *greening* em produtos cárneos mesmo quando armazenados à baixa temperatura.

4 . CAPÍTULO II – Oxidação do CO mediada pela perferrilmioglobina

4.1. Introdução

4.1.1 Monóxido de Carbono (CO)

O monóxido de carbono assim como o NO e o H₂S teve sua atividade biológica pouco reconhecida até meados da década de 90, sendo considerado apenas um gás tóxico até a recente identificação de sua produção endógena. O CO é produzido endogenamente como resultado da degradação de heme proteínas pela enzima heme oxigenase.⁷³ Desta forma, o papel do CO no organismo vem sendo estudado, e suas atividades de sinalização celular e anti-inflamatória principalmente no trato gastrointestinal foram reportadas em diversos trabalhos.^{74,75,76} O mecanismo de proteção contra a inflamação causada pela colite ulcerosa através da ação da enzima heme oxigenase foi reportada por Yoshikawa et al.,⁷⁷ onde os níveis de produção de CO foram atribuídos à uma possível ação anti-inflamatória deste gás que atuaria como fator de proteção do trato gastro-intestinal.

A oxidação de CO pelo músculo esquelético e tecido cardíaco foi primeiramente reportada por Coob em 1932⁷⁸ como a “queima” de monóxido de carbono mediado por estes tecidos. Posteriormente esta observação foi atribuída à oxidação do CO mediada pelo citocromo c na mitocôndria.⁷⁹ A oxidação de CO via citocromo c oxidase foi reportada *in vitro* por Young et al.^{80,81} e *in vivo* por Shimouchi et al.,⁸² e ambos reportaram a oxidação do CO levando à formação de CO₂ evidenciando um possível envolvimento em processos redox no organismo. Dentre as diversas vias complexas de proteção citológica exibidas pelo CO, pouco se sabe sobre a atividade antioxidante mediada por este gás na desativação de espécies hipervalentes importantes em condições de inflamação e estresse oxidativo.

Tendo em vista a mobilidade destes gases em proteínas heme hipervalentes bem como a desativação de radicais hidroperóxidos, o presente trabalho procurou determinar parâmetros cinéticos e termodinâmicos para o melhor entendimento da reatividade do CO com biomoléculas, bem como seu envolvimento em processos redox a fim de elucidar reações que ocorrem em produtos cárneos e sistemas biológicos.

4.2. Materiais e métodos

Ácido fórmico grau espectrometria de massas, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 , L-triptofano, mioglobina de coração de cavalo, Oxido de deutério (99,0% D), Rosa de Bengala, sais de $FeSO_4$ e $FeCl_3$, *Sephadex-G25*, ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeutério-propionico (TMSP-d4), Sal tetrasódico de alaranjado de xilenol, *meso*-tetra-(4-sulfonatofenil)-porfirinato de sódio foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A mioglobina foi purificada com o método descrito previamente na literatura.⁵⁹ O *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)-porfirinato de ferro (*Fe(III)TPPS*) foi preparada de acordo com procedimento descrito na literatura.⁸³ O Peróxido de hidrogênio 30% v/v foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). A Acetonitrila grau HPLC foi obtida da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA). A água deionizada foi obtida em um sistema de tratamento via osmose reversa seguido de purificação em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, USA).

4.2.1. Preparação e isolamento do TrpOOH

Uma suspensão de 30 mmol L⁻¹ de triptofano em D₂O foi saturada com O₂ na presença de 8 μmol L⁻¹ de rosa de bengala e irradiada com luz no comprimento de onda de 532 nm proveniente de um LED (5mW) durante o período de 2h à 0 °C mantendo-se fluxo constante de O₂, como apresentado na Figura 15.⁸⁴

Figura 15 – Reação entre triptofano e $^1\text{O}_2$ e arranjo utilizado para preparação fotoquímica do TrpOOH.

A solução irradiada foi filtrada para a remoção do excesso de corante Rosa de Bengala e triptofano residual utilizando-se filtro de membrana de Teflon de 0,2 μm (Chromafil, Macharey-Nagel GmbH & Co., Dueren, Alemanha).

O isolamento do TrpOOH dos demais produtos de degradação, bem como o triptofano remanescente foi realizado por cromatografia líquida semipreparativa (HPLC20A sistema Prominence com detector DAD SPDM20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) utilizando uma coluna Luna C18 fase reversa (250 mm x 7 mm x 10 μm ; Phenomenex Inc., North Hill, CA, USA) com fase móvel isocrática de 4% de acetonitrila em água e vazão de 1mL/min. As bandas cromatográficas foram coletadas em um frasco mantido em banho de gelo ao abrigo da luz e imediatamente liofilizado utilizando um ModulyoD *freeze-dryer* (Thermo Electron Corp., São Paulo, Brasil). A concentração de TrpOOH foi determinada pelo método

do *xlenol-orange* (método de FOX), utilizando o H_2O_2 como padrão.⁸⁵ O rendimento global para obtenção do TrpOOH com alto grau de pureza foi de 10%.

4.2.2. Caracterização do TrpOOH por espectroscopia de RMN

As análises de RMN (^1H , COZY e HSQC) foram realizadas à 25 °C em um equipamento Bruker AVACE III, 14,1 T (600MHz para frequência de hidrogênio) equipado com um amostrador automático, criosonda TCI (^1H / ^{13}C / ^{15}N) de 5 mm com ATMA (*Automatic Tuning Matching*) e equipado com gradiente de campo (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Alemanha). Alíquotas de cada produto isolado foram dissolvidas em D_2O contendo 0,050% w/w TMSP- d_4 para análises de RMN. O experimento de ^1H RMN foi baseado na versão 1D da sequência de NOESYPRESAT, usando supressão do sinal de água (2,40 s). O espectro foi obtido usando 64 K pontos com largura do espectro de 12019,23 Hz gerando um tempo de aquisição de 2,73 s. O processamento dos dados foi realizado utilizando multiplicação exponencial, aplicando fator de alargamento de linha de 0,3 Hz. Os experimentos de ^1H - ^1H COSY foram realizados com largura do espectro de 12019,23 Hz, com tempo de aquisição de 0,17 s, tempo de relaxação de 1 s, e um total de 16 varreduras para cada incremento (256 incremento). O experimento de ^1H - ^{13}C HSQC foi realizado com largura do espectro de 12019,23 Hz para dimensão F2 (^1H) e 36057,69 Hz para dimensão F1 (^{13}C). O tempo de aquisição foi de 0,17 s com tempo de relaxação de 1s, e um total de 64 varreduras foram realizadas para cada incremento (256 incrementos). A aquisição de dados e processamento foram realizados utilizando o software TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin).

4.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

A identificação do produto de oxidação do CO mediado por heme proteína e outras fontes de ferro, foi realizada com o auxílio da técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR) utilizando-se um FT-IR Affinity-1 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), que possibilitou a observação do espectro característico de CO_2 após a adição de H_2O_2 às espécies em estudo previamente saturadas com CO.

Os experimentos envolvendo a técnica FT-IR foram realizados utilizando-se uma cubeta de quartzo cilíndrica com 5 cm de caminho óptico e vedada com um septo. A cubeta foi introduzida em um orifício cilíndrico do suporte de amostra do espectrofotômetro de maneira que apenas a fase gasosa fosse exposta ao caminho óptico da radiação incidente, como mostra a Figura 16.

Figura 16 - Arranjo experimental para aquisição de espectros FT-IR da fase gasosa.

Todos os experimentos de FT-IR iniciaram com uma etapa prévia para o ajuste do equipamento. Desta forma uma alíquota de 2 mL de tampão foi saturado com CO durante 20 minutos permitindo a entrada de O₂, pois sem esta etapa o radical peroxila de interesse (TrpOO[•]) não é gerado quando o experimento é realizado na presença de mioglobina. Assim por um período de 1 hora o equipamento foi ajustado, realizando-se a operação de *background* para descontar qualquer sinal de CO₂ residual e a subsequente obtenção de espectros sucessivos para garantir que qualquer outra fonte de CO₂ externa não afetasse o experimento. Durante todo o experimento o fluxo de purga com N₂ do equipamento foi mantido constante.

Experimento A

Uma alíquota de 2mL de uma solução de concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(III), ou lactoperoxidase, ou Fe(III)TPPS em tampão fosfato pH 7,4, com força iônica 0,16 foi saturada com CO por 20 minutos e quantidade equimolar de peróxido foi adicionada. Após 1h de reação foi obtido o espectro de infravermelho.

Experimento B

Uma alíquota de 2mL de uma solução de concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe(III), ou Fe(II), ou Fe(III)TPPS em tampão formiato com pH 4,7 e força iônica de 0,16 foi saturada com CO por 20 minutos e quantidade equimolar de TrpOOH foi adicionada. Após 1h de reação foi obtido o espectro de infravermelho.

Experimento C

Uma alíquota de 2 mL de uma solução de concentração de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ MbFe(IV)=O (obtido da reação de H_2O_2 com MbFe(III)) tampão fosfato pH 7,4, força iônica 0,16 foi saturada com CO por 20 minutos e quantidade equimolar de TrpOOH foi adicionada. Após 1h de reação foi obtido o espectro de infravermelho.

Os mesmos espectros nas mesmas condições de pH e força iônica foram obtidos saturando-se o tampão com CO e adicionando-se H_2O_2 ou TrpOOH na ausência de ferro.

4.2.4. Espectroscopia Freeze-Quench/EPR

O estudo do radical perferrilmioglobina foi conduzido utilizando-se a técnica de Freeze-Quench que é utilizada para o preparo de amostras mediante a interrupção de reação por congelamento para experimentos de EPR. Este congelamento pode ser realizado manualmente, mergulhando-se o tubo de EPR contendo a mistura reacional em N_2 líquido, ou pode ser proferido em um equipamento que permite o congelamento na ordem de milissegundos. Em um equipamento de Freeze-Quench a mistura reacional é ejetada (tempo morto de 3 milissegundos) da câmara de mistura (com diferentes tempos de envelhecimento) em um banho criogênico do qual a amostra é coletada por um funil coletor e adicionada a um tubo de EPR preso a este funil. Todo o sistema (funil mais tubo de EPR) deve

ser mantido submerso em isopentano e resfriado constantemente com N_2 líquido, o que torna a coleta da amostra um processo pouco efetivo e muitas vezes impraticável. Assim um novo procedimento para coleta de amostra foi desenvolvido no presente trabalho. Neste procedimento por motivos de praticidade o banho criogênico foi substituído por um dedo frio contendo N_2 líquido que servia de recipiente coletor. Assim uma maior eficiência no preparo das amostras foi obtida, pois o próprio recipiente de coleta poderia ser introduzido diretamente na cavidade do equipamento de EPR para obtenção dos espectros, Figura 17.

Figura 17 - Sistema de freeze-quench e dedo frio contendo N_2 líquido e amostra coletada em sua parte inferior.

O equipamento utilizado para o preparo das amostras foi um SFM-20 Freeze-Quench (Biologic Scientific Instruments, Claix, França), contendo duas seringas (S1

e S2). A seringa S1 continha uma solução de $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(III) na presença ou ausência de saturação com CO e a seringa S2 continha uma solução de H_2O_2 com $7,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que a concentração final manteve a estequiometria de 1:1, pois foram misturados volumes diferentes de cada seringa a fim de diminuir a diluição da perferrilmioglobina gerada. Desta forma foram preparadas amostras com diferentes tempos de envelhecimento na presença e ausência de CO e os espectros de EPR foram obtidos.

Os espectros de EPR foram recordados em um espectrômetro de EPR EMXplus operando na banda X (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe, Alemanha) usando uma cavidade cilíndrica TM101. Os parâmetros espectrais foram: amplitude de modulação, 3,00 G; centro de campo, 3395,58 G; constante de tempo, 81,92 ms; frequência ~9,52 GHz; frequência de modulação, 100,00 kHz; largura espectral, 200 G; potência de micro-onda, 2,00 mW; tempo de conversão 81,92 ms; e temperatura de 77 K. Cada espectro é uma média quadrática de oito varreduras.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Oxidação de CO mediada pela Perferrilmioglobina

O radical formado pela transferência de um elétron dos aminoácidos triptofano ou tirosina para o π -cátion radical na porfirina, induz, na presença de oxigênio, a formação do radical peroxila no resíduo de aminoácido Trp14 ($\text{TrpOO}^\bullet$). Esta espécie chamada de perferrilmioglobina ($\bullet\text{MbFe(IV)=O}$),²⁶ possui tempo de vida na ordem de 30 segundos em pH neutro e a temperatura de 25 °C.²⁰

A Figura 18 mostra os espectros de EPR da espécie perferrilmioglobina após a reação da MbFe(III) com H_2O_2 em concentração equimolar em diferentes tempos de envelhecimento na presença e ausência de CO. O espectro de EPR em condições aeróbias apresenta os sinais do radical $\text{TrpOO}^\bullet$ ($g_x = 2,036$; $g_y = 2,008$; $g_z = 2,0028$) e outro um septeto em $g = 2,005$ referente ao radical $\text{Tyr}^\bullet$ (2,005).^{20,19}

Figura 18 - Espectros de EPR da $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ durante a redução para MbFe(IV)=O à temperatura de 77 K em tampão fosfato pH 7,4 na presença de CO (A) ou ausência de CO (B). Os espectros foram recordados de amostras com diferentes tempos de envelhecimento. Cada espectro é proveniente de um experimento e o decaimento do radical peroxila ($g=2,036$) e foi normalizado relativo ao decaimento do radical tirosina ($g=2,005$) pela razão entre as áreas dos sinais.

O decaimento do radical $\text{TrpOO}^\bullet$ se processa por uma lenta transferência de elétrons intramolecular ou via redução por uma molécula redutora externa o mesmo podendo ocorrer para o radical $\text{Tyr}^\bullet$.^{86,87} A razão entre a área correspondente exclusivamente ao sinal do radical $\text{TrpOO}^\bullet$ em $g_x = 2,036$ (área 1, figura 18) e os sinais correspondente às componentes $g_y = 2,008$ e $g_z = 2,0028$ somada ao sinal septeto do radical $\text{Tyr}^\bullet$ $g = 2,005$ (área 2 Figura 18) fornece um parâmetro comparativo para avaliar a velocidade de reação referente unicamente à reação do CO com o radical $\text{TrpOO}^\bullet$ (Figura 19). A razão entre as áreas, como mostrado na Figura 18 foi utilizada para seguir o decaimento do radical peroxila contido no triptofano na presença (Figura 19-A) e ausência (Figura 19-B) de CO utilizando-se a técnica de freeze-quench EPR. O decaimento segue um mecanismo de primeira ordem tanto na presença como na ausência de CO, observando-se um aumento na velocidade de decaimento quando na presença de CO. As constantes calculadas

foram de $k = (2,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ na presença de CO e $(5,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ na ausência de CO.

Figura 19 - Decaimento referente ao radical $\text{TrpOO}^{\bullet}$ da espécie reativa perferrilmioglobina em solução aquosa pH 7,4 e 25 °C na presença de CO (A) e na ausência de CO (B).

A reação entre CO e $\text{TrpOO}^{\bullet}$ resulta em uma oxidação do CO sendo liberado CO_2 em quantidades muito pequenas. Assim, para medir o CO_2 liberado pela reação foi necessária a utilização de uma medida direta com a técnica de FT-IR da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida, Figura 20.

Figura 20 - Cubeta de quartzo cilíndrica utilizada para a obtenção dos espectros de FT-IR.

A detecção de CO_2 foi possível devido ao aparecimento das bandas em 2335 e 2361 cm^{-1} em diferentes condições experimentais como mostra a Figura 21. Os espectros foram recordados após 60 minutos de reação e equilíbrio entre a fase gasosa-líquida.⁸¹

Figura 21 - Espectro FT-IR da fase gasosa em pH 7,4 e $25\text{ }^\circ\text{C}$ após 60 minutos de reação e equilíbrio da fase gasosa e líquida. $[\text{MbFe(III)}] = 1\text{ }10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1\text{ }10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}] = 7\text{ }10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{TrpOOH}] = 1\text{ }10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Fe(III)TPPS}] = 1\text{ }10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$.

O hidropéroxido do resíduo de aminoácido triptofano utilizado na presença de diferentes espécies de ferro ou mioglobina foi preparado fotoquimicamente usando

rosa de bengala como fotossensibilizador para formação do oxigênio singlete excitado. O produto da reação fotoquímica foi isolado por HPLC empregando uma coluna semipreparativa C18 de fase reversa. A obtenção do hidroperóxido foi realizada através da fotólise de uma solução de 30 mmol L⁻¹ de triptofano contendo 8 µmol L⁻¹ de rosa de bengala usando um laser verde de LED (5 mW) por 2 horas em banho de gelo a 0 °C resultando na formação como produto principal os isômeros *cis*- e *trans*- como pode ser visto na Figura 22.

Figura 22 - Separação e caracterização do hidroperóxido *trans/cis* formado através da adição de oxigênio singlete ao triptofano em D₂O saturado com O₂ com rosa de bengala usado como fotossensibilizador e exposto ao LED de comprimento de onda 532 nm. Os traços em vermelho indicam os pontos de início e final de coleta das bandas cromatográficas P1 (isômero *trans*) e P2 (isômero *cis*).

A identificação dos compostos coletados das bandas cromatográficas P1 e P2 foi confirmada por RMN 1D e 2D (¹H/COSY/HSQC) depois do isolamento o espectro HSQC foi coletado para a banda cromatográfica P2 e identificado como o isômero

cis-TrpOOH e o espectro está apresentado na Figura 23. Assim as espécies *cis* e *trans* foram completamente caracterizadas por experimentos de ^1H , COSY e HSQC e os resultados obtidos estão de acordo com dados reportados na literatura⁸⁸. A diferença mais marcante para o espectro RMN de ^1H para diferenciar os derivados *cis*- e *trans*-TrpOOH está associada aos hidrogênios do grupamento metilileno C_3 . Como pode ser visto na Tabela 2, o derivado *cis*-TrpOOH apresenta os hidrogênios em C_3 magneticamente equivalentes e aparecem como um dubleto em 2,66 ppm. Por outro lado, os hidrogênios C_3 para o derivado *trans*-TrpOOH apresentam um padrão de acoplamento de duplos-dubletos para hidrogênios não equivalentes em um sistema ABX sendo AB os dois hidrogênios não equivalentes e o hidrogênio H_2 a parte X.

Figura 23 - Espectro ^1H - ^{13}C HSQC do *cis*-TrpOOH. Condições: Largura espectral de 12019,23 Hz para dimensão F2 (H^1) e 36057,69 Hz para a dimensão F1 (^{13}C). Tempo de aquisição 0,17 s e tempo de relaxação 1s, e 64 varreduras para cada incremento (256 incrementos). A aquisição e processamento de dados foi realizada utilizando-se o programa TopSpin 3,0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany).

Tabela 2 - Deslocamentos químicos para RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos *cis*- and *trans*-TrpOOH em D_2O

<i>trans</i> -TrpOOH					<i>cis</i> -TrpOOH			
posição	d (ppm)	^1H multiplicidade	J_{xy} (Hz)	^{13}C d (ppm)	d (ppm)	^1H multiplicidade	J_{xy} (Hz)	^{13}C d (ppm)
2	4,19	t	7,8	59,7	3,83	t	9,6	59,8
3	2,91	dd	13,1	35,8				
			7,1					
	2,52	t	14,3		2,66	d	8,8	39,0
			7,2					
4	7,46	d	7,9	125	7,44	d	7,4	124
5	7,03	t	7,5	121	7,00	t	7,4	121
6	7,38	t	7,7	131	7,35	t	7,7	131
7	6,80	d	8,1	111	6,86	d	8,0	111
8 ^a	5,72	s		79,5	5,54	s		79,2

A oxidação de CO para CO_2 foi observada apenas na presença do complexo Fe(III)TPPS ou sais de ferro FeSO_4 ou FeCl_3 . A eficiência desses compostos em oxidar CO à CO_2 para condições e tempo de reação comparáveis, está apresentada na Figura 24 na forma de área total dos picos de FT-IR que representa a quantidade relativa de CO_2 liberado.

Figura 24 - Produção de CO₂ das misturas reacionais mostradas na Figura 21 através da integração do sinal de CO₂ de 2280 à 2400 cm⁻¹.

Os dados apresentados na Figura 24 demonstram que H₂O₂ na presença de CO não produz CO₂ em tampão pH 7,4 a 25 °C na ausência de sais de ferro ou Fe(III)TPPS, da mesma forma que soluções de triptofano incubadas com CO na presença de peróxido de hidrogênio. O triptofano hidroperóxido juntamente com CO não produziu CO₂, no entanto quando na presença de sais de ferro ou Fe(III)TPPS este produz CO₂. Assim podemos concluir que a reatividade do triptofano hidroperóxido depende de sua clivagem através da reação de oxidação ou redução de Fe(II) ou Fe(III), respectivamente.

O radical triptofano reage com CO mediante a transferência de átomo de oxigênio⁸⁹ de acordo com a Equação 3 e 4.

A velocidade de reação da espécie $\text{ROO}^\bullet$ com CO tem sido reportada como mais rápida com relação à espécie $\text{TrpO}^\bullet$ por um fator de 10^2 .⁸⁹

A formação da ferrilmioglobina e a reação desta com CO não apresentou reatividade demonstrando que apenas o radical perferrilmioglobina é a espécie reativa. A presença de TrpOOH juntamente com a ferrilmioglobina aumenta moderadamente a reatividade mostrando que o ferro-Heme pode clivar o peróxido oxidativamente como mostrado na Equação 1 levando a formação de radicais hidroperóxidos que poderiam converter a ferrilmioglobina novamente em perferrilmioglobina.

A fim de comparação juntamente às espécies de ferro utilizou-se uma outra enzima com atividade de peroxidase, a lactoperoxidase que possui grupo heme Fe(III) e resíduo de aminoácido triptofano. Esta enzima após ativada por H_2O_2 apresentou menor atividade do que a MbFe(III) na presença de CO.⁹⁰

A reatividade das duas espécies de radical triptofano, $\text{TrpOO}^\bullet$ e $\text{TrpO}^\bullet$, na reação de transferência de oxigênio para o CO são encontradas paralelamente na MbFe(III) ativada por H_2O_2 na presença de O_2 :

A espécie $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ representa o radical peroxila no triptofano como mostrado na Equação 5 que reage com CO em uma reação similar à descrita pela Equação 3 para levar a formação de CO_2 . O radical alcóxila resultante da primeira etapa pode ainda oxidar uma segunda molécula de CO como mostra a Equação 4. O radical centrado no carbono do resíduo de amino ácido triptofano decairá por um mecanismo intramolecular para formar o radical tirosina centrado no carbono que apresenta maior estabilidade que poderá sofrer reação de terminação formando dímero. Esta sequência de reações está representada pela Equação 5 considerando as observações relacionadas ao CO_2 formado em diferentes misturas reacionais, bem como os espectros de EPR apresentados na Figura 18. Notavelmente, apenas a espécie $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ e não MbFe(IV)=O é capaz de oxidar CO à CO_2 .

O dado experimental obtido para o decaimento da espécie $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ na presença de CO torna possível (considerando a concentração de solução saturada de CO de $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) estimar a constante de velocidade da reação entre $\bullet\text{MbFe(IV)=O}$ e CO como sendo de $(3,30 \pm 0,6) \cdot 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O que pode ser o primeiro valor reportado na literatura para a constante de velocidade para a reação entre o radical perferrilmioglobina com um redutor externo. Valores limite estimados para a desativação da perferrilmioglobina pelo carotenoide solúvel em água crocina o qual um valor limite para a constante de velocidade foi estimado em $4 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ³¹ e a reação com (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) para formar $\text{ABTS}^{*\bullet}$ com constante estimada em $6 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁹¹ A reação com crocina, Equação 6 tem mecanismo via transferência de elétrons o que explica a maior velocidade quando comparado ao CO que obedece o mecanismo de transferência de átomo de oxigênio.

4.4. Conclusões

A mioglobina ativada, que será formada durante a digestão da carne vermelha através da reação da MbFe(III) com peróxidos, pode ser desativada pela reação com CO. A reação com CO envolve a transferência de átomo de oxigênio para formar CO_2 à princípio em um mecanismo envolvendo duas etapas e eventualmente formando o dímero através de ligação de duas tirosinas. A desativação através da reação com CO poderia ser uma forma de proteger estruturas sensíveis contra o dano oxidativo causado à proteínas e lipídeos insaturados. Desta forma seria possível atribuir ao CO a função de antioxidante em meio biológico. Experimentos futuros são necessários para investigar como o CO pode atuar sinergicamente com antioxidantes da dieta como polifenóis e crotenóides através da ligação do ferro da mioglobina ou a subsequente redução da espécie MbFe(IV)=O seguida da redução inicial pelo CO.

5. Capítulo III – Redução da ferrilmioglobina por aminoácidos sulfurados

5.1. Introdução

Conforme discutido anteriormente, as espécies hipervalentes de ferro heme são formadas durante a digestão da carne vermelha através da ativação da metamioglobina (MbFe(III)) pelo peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos formando a espécie reativa e de curto tempo de vida perferril ($\bullet\text{MbFe(IV)=O}$) e subsequente formação da espécie reativa de longo tempo de vida ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O).¹⁷ Ambas espécies, composto I e II respectivamente, são conhecidas por serem iniciadores de oxidação de proteínas e lipídeos em carne e produtos cárneos durante o processamento e estocagem, afetando negativamente a qualidade do produto.^{92,93} Estas espécies oxidantes de ferro-heme hipervalente podem também ser formados durante a digestão da carne vermelha, promovendo a geração de radicais e induzindo a condição de estresse oxidativo no trato gastrointestinal. Assim, diversos estudos epidemiológicos associam o consumo de carne vermelha ao desenvolvimento de câncer no cólon de intestino.⁹⁴

Os tióis e o H_2S são conhecidos por reagir com MbFe(IV)=O para formar sulfomioglobina (sulfMb).⁹⁵ A SulfMb , assim como a mioglobina, pode existir em sua forma reduzida (SulfMbFe(II)) ou oxidada (SulfMbFe(III)).^{52,96} A cisteína está entre os aminoácidos essenciais com atividade redutora em meio biológico e sua atividade antioxidante é exibida tanto em sua forma livre como quando está incorporada na cadeia polipeptídica de proteínas. A cisteína e o peptídeo glutathione também são reconhecidos por sua ação cito-protetiva contra falência renal aguda que ocorre devido à presença de mioglobina na urina, condição esta dependente da peroxidação lipídica catalisada por ferro-heme (mioglobinúria).⁹⁷

A redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína é afetada pelo pH ^{60,95} do meio. A complexidade dos dados espectrais de absorção eletrônica UV-Vis obtidos durante o processo de redução da ferrilmioglobina pela cisteína requer tratamento matemático para identificar e decodificar os espectros eletrônicos de absorção de cada intermediário e produto de reação formado em diferentes condições de pH . No caso do presente trabalho, os espectros foram decodificados com auxílio do método de *multivariate curve resolution* (MCR).⁹⁸

Os mecanismos aqui delineados foram propostos com base nas componentes espectrais obtidos através do uso da técnica de MCR e do perfil de concentração com o tempo dos componentes individuais na mistura reacional como proposto anteriormente por Pindstrup et al.⁶⁰ Desta forma, o estudo cinético foi conduzido a fim de identificar-se os diferentes mecanismos de reação variando-se as condições de pH do meio reacional a fim de se determinar as constantes de velocidade específica para a discussão dos mecanismos de reação envolvidos no processo redox de proteção antioxidante.

5.2. Materiais e Métodos

L-cisteína foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Glutathione, L-homocisteína, e peróxido de hidrogênio (30% v/v) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e usados sem tratamento prévio. Catalase de fígado bovino e mioglobina de coração de cavalo (pureza > 90 %) foram obtidas da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A proteína mioglobina foi purificada como descrito na literatura.⁶⁰ Ácido acético foi obtido da AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemanha). O K_2HPO_4 e KH_2PO_4 usados foram de grau analítico e obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, US). A água deionizada foi obtida em um sistema de tratamento via osmose reversa seguido de purificação em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, USA).

5.2.1. Experimento cinético de redução da MbFe(IV)=O pela cisteína

Soluções estoque de cisteína na concentração de $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em meio de solução tampão com pH ajustado e apropriado. A ferrilmioglobina foi preparada através da reação da metamioglobina na concentração de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com H_2O_2 em proporção estequiométrica de 1:2. O excesso de H_2O_2 foi removido através da adição de 13 μL de uma solução de catalase (9,4 mg/mL) em 1 mL da solução reacional. Os experimentos cinéticos em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,2 foram realizadas em uma cubeta de quartzo (Hellma Analytics, Müllheim, Alemanha) de 1cm x 1cm contendo dois compartimentos para mistura rápida e os espectros eletrônicos de absorção UV-Vis foram registrados em comprimentos de

onda entre 200 nm e 800 nm em diferentes intervalos de tempo em um espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific, Bremen, Alemanha). Os experimentos foram termostatizados à temperatura de 20,0; 25,0; ou 30,0 °C. Os experimentos cinéticos em meio aquoso em pH 4,5; 5,0; 5,6; e 6,2 foram realizados utilizando tampão apropriado com o auxílio de um sistema de mistura rápida e sequencial com injeção de amostra por parada de fluxo (*stopped-flow*) *Applied Photophysics* SX20 acoplado a um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos. A espécie reativa ferrilmioglobina é instável (veja-se curva de autodecaimento em função do pH, Figura 25) em condições de pH do meio reacional entre 4,5 e 6,2,. Em soluções ácidas, a reação foi realizada misturando uma solução contendo ferrilmioglobina em tampão fosfato pH 7,4 de baixa força iônica com uma solução ácida de cisteína em tampão acetato para os pH 4,5; 5,0; e 5,6 ou tampão fosfato para as reações em meio com pH ajustado a 6,2 e 6,5. A força iônica da solução de cisteína foi de 0,32 mol L⁻¹, e assim a força iônica final da mistura reacional foi de 0,16 mol L⁻¹ e com o respectivo pH desejado. A aferição da concentração hidrogênionica do meio reacional foi efetuada por meio da mistura 1:1 entre o tampão de baixa força iônica e o tampão ácido com força iônica de 0,32 mol L⁻¹ e a leitura do valor de pH da mistura efetuada em um pH-metro de eletrodo de vidro combinado.

A formação da espécie sulfomioglobina foi monitorada em 625 nm e o decaimento da espécie ferrilmioglobina em 580 nm em condições de pseudo-primeira ordem com crescentes concentrações de cisteína. A constante de autodecaimento para a ferrilmioglobina foi determinada pela mistura de iguais volumes de ferrilmioglobina em tampão de baixa força iônica e pH 7,4 com o tampão ácido de força iônica 0,32 mol L⁻¹ resultando em um tampão com força iônica 0,16 e o pH final da mistura reacional adequado a cada experimento.

5.3. Resultados e Discussão

Em um primeiro momento procurou-se estudar o processo de auto-redução da espécie ferrilmioglobina e sua dependência com a concentração hidrogeniônica do meio. A Figura 25 ilustra os valores de constante de pseudo-primeira ordem de

autoredução, k_{obs} (s^{-1}), para o processo de auto-redução da espécie ferrilmioglobina em função do pH do meio.

Figura 25 - Constante de pseudo-primeira ordem do processo de auto-redução da espécie ferrilmioglobina em função do pH do meio. Experimentos realizados empregando-se uma solução de MbFe(IV)=O na concentração de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações hidrogeniônicas e força iônica de 0,16.

Conforme é observado pela análise da Figura 25, observa-se uma alta dependência da constante de velocidade de auto-redução com o pH do meio. Esta dependência pode ser interpretada pelo envolvimento da espécie MbFe(IV)=O em um equilíbrio ácido-base de acordo com a reação 1

Não há dependência da constante de velocidade observada com a concentração do tampão, indicando uma catálise ácida específica na reação de autoredução de acordo com a Equação 1

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}^+}[\text{H}^+] + k_{0_autoredução} \quad (1)$$

onde $k_{0_autoredução}$ é a constante de velocidade de primeira ordem para a reação de autoredução não catalisada por íons H^+ .

A redução da espécie ferritmioglobina, $MbFe(IV)=O$, pela cisteína⁹⁵ produzindo a metamioglobina, $MbFe(III)$, e sulfomioglobina, $SulfMbFe(II)$, é reportado na literatura. No entanto, a dependência desta reação com a concentração hidrogênica do meio não foi estudada. A reação de redução da espécie $MbFe(IV)=O$ pode ser investigada utilizando-se da espectroscopia UV-Vis para monitorar em tempo real os precursores e produtos de reação, como ilustrado na Figura 26.

Figura 26 - Espectro de absorção eletrônica da reação entre a espécie $MbFe(IV)=O$ ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a cisteína ($2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). (A) pH 5,6, espectros registrados a cada 1s utilizando a técnica stopped-flow. (B) pH 6,5, espectros coletados a cada 5 s; (C) pH 7,4, espectros coletados a cada 10s; (D) pH 8,2, espectros coletados a cada 10s.

Entretanto, a espécie $MbFe(IV)=O$ e os produtos de redução $MbFe(III)$ e $sulfMbFe(II)$, apresentam espectros eletrônicos de absorção com intensa sobreposição, Figura 27.

Figura 27 - Espectros eletrônicos de absorção para as espécies MbFe(IV)=O, MbFe(III), e SufMbFe(II) obtido da reação de redução de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O com $3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2S em condição de pH = 6,2 e temperatura de 25 °C.

Desta forma, o método de deconvolução e extração do espectro individual de cada componente durante o curso da reação com auxílio da técnica de *multivariate curve resolution* (MCR) contribui significativamente para o conhecimento do perfil de concentração de cada espécie no curso da reação. O método de MCR foi aplicado aos espectros da reação de redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína em condições de pseudo-primeira ordem a fim de se obter a variação da concentração de cada espécie, precursor e produto de reação, com o tempo e esta variação por sua vez foi ajustada às leis de velocidade representadas pelas equações (2) a (4) e derivadas segundo o esquema de reação 5.

$$-d[\text{MbFe(IV)=O}]/dt = -k_1[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis}] - k_2[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis}] \quad (2)$$

$$d[\text{MbFe(III)}]/dt = k_2[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis}] - k_3[\text{MbFe(III)}][\text{cis}] \quad (3)$$

$$d[\text{SufMbFe(II)}]/dt = k_1[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis}] + k_3[\text{MbFe(III)}][\text{cis}] \quad (4)$$

Esquema 5 - Esquema reacional em meio ácido à neutro ilustrando as vias reacionais relacionadas às equações de velocidade (2) - (4)

Os dados cinéticos coletados para os experimentos realizados em condições com pH ajustado para 6,0, 7,0 e 8,0, demonstram que apenas a reação de redução da espécie reativa MbFe(IV)=O pela cisteína que leva à formação da espécie SulfMbFe(II) contribui significativamente para a velocidade global de redução da espécie reativa MbFe(IV)=O , Esquema 5, uma vez que $k_1 \gg k_2 > k_3$ como mostra os dados contidos na Figura 28 (A, B e C).

Figura 28 - Constantes de primeira ordem em s^{-1} para reação $MbFe(IV)=O$ e $MbFe(III)$ com cisteína a $25\text{ }^{\circ}C$ como função do excesso de cisteína para o pH = 6 (A: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH = 7 (B: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH = 8 (C: $k_1'=\blacksquare$, $k_2'=\bullet$, $k_3'=\blacktriangle$), para pH =9 (D: $k_4'=\blacksquare$, $k_5'=\bullet$, $k_6'=\blacktriangle$). A qualidade do ajuste não linear foi validada através dos valores residuais; estes valores estão apresentados na Tabela 3.

A Figura 28 contém as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem k_1' , k_2' e k_3' em função da concentração crescente de cisteína em condições de excesso de tiol. Desta forma, para as reações de redução conduzidas em pH 6,0, 7,0 e 8,0, apenas a reação correspondente ao primeiro termo da Equação 1 contribui significativamente para a reação global de redução e assim, $k_1'(s^{-1})$ pode ser descrito pela Equação 5

$$k_1' = k_{\text{autoredução}} + k_1 [\text{cisteína}] \quad (5)$$

A constante de velocidade de segunda ordem k_1 ($L\text{ mol}^{-1}\text{ s}^{-1}$), eq. (5), foi obtida através do coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear da equação de reta ao gráfico de k_1' versus concentração de cisteína, Figura 27. O valor da constante de segunda-ordem da redução da espécie ferrilmioglobina pela cisteína, k_1 , apresenta forte dependência e de modo complexo com o pH do meio reacional, sendo assim analisada em maior detalhe e profundidade posteriormente.

Havendo como base os resultados supracitados, pode-se especular que qualquer indício de formação da espécie MbFe(III) nas condições experimentais em meio com pH 6,0, 7,0 e 8,0 é resultado apenas do processo de auto-redução da espécie MbFe(IV)=O. Assim, a espécie MbFe(III) pode ser considerada, neste sistema, apenas como um espectador na reação de redução de MbFe(IV)=O e formação de SulfMbFe(II).

A Figura 29 ilustra como exemplo a evolução temporal da concentração das espécies SulfMbFe(II), MbFe(III), bem como o decaimento da espécie MbFe(IV)=O no curso da reação de redução pela cisteína em condições de pH ajustado para 7,0 e com a concentração de cisteína em excesso de $9,43 \text{ mmol L}^{-1}$ e a temperatura de 25°C .

Figura 29 - Ajustes não lineares utilizando as equações (2) a (4) para os perfis de concentração para a espécie MbFe(IV)=O ($\blacktriangledown$) como reagente e as espécies sulfMbFe(II) ($\blacksquare$) e MbFe(III) ($\blacklozenge$) como produtos na reação de redução da MbFe(IV)=O pela cisteína em meio aquoso com pH = 7 e à temperatura de 25°C .

Como pode ser observado na Figura 29 a concentração da espécie MbFe(III) no tempo zero da reação de redução da espécie MbFe(IV)=O com sua concentração praticamente inalterada no curso da reação e em concordância com o seu papel como espectador e a insignificância do segundo termo das Equações 2 e 4, bem como podendo considerar a contribuição da Equação 3 desprezível.

Tabela 3 - Qualidade do ajuste não linear validado pelo valor residual (%) para as constantes de velocidade de pseudo-primeria ordem k_1 a k_6 para cada concentração de cisteína na reação de redução das espécies MbFe(IV)=O e MbFe(III) à temperatura de 25 °C e diferentes condições de pH. Valor residual total (%) para a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem k_1 a k_3 (pH 6, 7 e 8) e k_4 a k_6 (pH 9) para cada concentração em excesso de cisteína

[cisteína] / $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	Residuais k_1	Residuais k_2	Residuais k_3	Residuais totais
<i>pH 6</i>				
0,94	9,93	5,88	5,28	7,32
1,57	10,4	6,21	4,91	7,42
3,14	10,3	6,65	3,74	6,19
6,29	10,4	4,43	3,40	5,41
9,43	9,98	4,60	2,99	4,87
<i>pH 7</i>				
0,94	21,3	10,2	6,61	11,7
1,57	20,6	11,1	6,78	11,5
3,14	17,4	9,51	3,52	7,17
6,30	14,9	9,94	2,44	5,17
9,43	13,1	10,1	1,69	3,79
<i>pH 8</i>				
0,94	13,0	22,0	4,73	8,67
1,57	15,9	26,1	5,25	9,34
3,14	14,2	32,7	3,87	7,56
6,30	15,3	51,7	3,76	7,33
9,43	14,8	48,9	3,27	4,41
[cisteína] / $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	Residuais k_4	Residuais k_5	Residuais k_6	Total residuais
<i>pH 9</i>				
0,94	4,40	1,39	46,7	2,76
1,57	5,40	1,40	39,4	2,79
3,14	3,11	1,29	24,3	2,64
6,30	2,79	0,80	8,57	1,61
9,43	2,24	1,11	2,65	1,44

Para os experimentos em condições alcalinas, pH = 9, a espécie MbFe(IV)=O reage com a cisteína formando majoritariamente a espécie MbFe(III) e subsequente redução levando a formação da espécie MbFe(II)O₂ em meio aeróbico. Não é observada, através dos espectros eletrônicos de absorção a formação da espécie SulfMbFe(II) nestas condições experimentais. Fato este em concordância com o reportado na literatura.⁶⁰ O esquema 6 ilustra de as possíveis reações de redox envolvidas no processo de redução da espécie ferrilmioglobina pelo íon tiolato (cisteína; RS⁻) em meio alcalino.

Esquema 6 - Esquema reacional em meio alcalino ilustrando as vias reacionais relacionadas as equações de velocidade (6) – (8)

Através das reações descritas no esquema 6 pode-se escrever as seguintes equações de velocidade para a redução da espécie ferrilmioglobina e formação das espécies metamioglobina e oximioglobina em condições alcalinas e na presença de oxigênio

$$-d[\text{MbFe(IV)=O}]/dt = k_4[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis-}] \quad (6)$$

$$d[\text{MbFe(III)}]/dt = k_4[\text{MbFe(IV)=O}][\text{cis-}] - k_5[\text{MbFe(III)}][\text{cis-}] + k_6[\text{MbFe(II)O}_2] \quad (7)$$

$$d[\text{MbFe(II)O}_2]/dt = k_5[\text{MbFe(III)}][\text{cis-}] - k_6[\text{MbFe(II)O}_2] \quad (8)$$

A análise do perfil de concentração das espécies obtidos através do uso do método de MCR no decorrer da reação de redução e com subsequente ajuste às Equações de velocidade 6 a 8, Figura 28 D, demonstram que em condições alcalinas, pH = 9, a reação correspondente ao primeiro termo da Equação 6 determina a velocidade de formação da espécie MbFe(II)O₂ uma vez que a contribuição das constantes de velocidade k₄ e k₆, eq. 6 a 8, é desprezível. Nestas condições experimentais, a cisteína encontra-se predominantemente na forma do íon tiolato, levando-se em consideração os valores de pK_a de 8,3 para o tiol e 10,7 para o grupo amina.⁹⁹

Afim de melhor explorar a dependência da redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína com o pH em condições relevantes para a química de produtos cárneos e digestão da carne no trato gastrointestinal, a formação da espécie SulfMbFe(II) foi acompanhada para o intervalo de pH entre 4,5 e 8,2 utilizando-se do comprimento de onda centrado em 625 nm (Figura 30A). O comprimento de onda utilizado foi escolhido devido ao ponto isobéptico (Figura 30C) apresentado para a conversão da espécie MbFe(IV)=O em MbFe(III) possibilitando assim, a observação apenas a formação da espécie SulfMbFe(II) sem interferência espectral durante todo o curso da reação de redução.⁶⁰ A constante de velocidade observada de pseudo-primeira ordem corresponde à k_1' na Equação 2 e 3 e na Figura 27 (A, B, C) apresenta dependência linear com o aumento da concentração em excesso do redutor, cisteína, como ilustrado Figura 30 (A e B) para a reação em meio aquoso pH 7,4 e temperatura de 25 °C. O intercepto no eixo-y obtido pela regressão linear dos dados contidos na Figura 30 B, corrobora com os valores de constante de velocidade de autoredução da espécie ferrilmioglobina em condições de pH 7,7 e a temperatura de 25 °C.³⁴

Figura 30 - (A) Variação da absorbância em 625 nm com o tempo para a formação da espécie sulfMbFe(II) durante a redução de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O em 7,4 a temperatura de 25°C com o aumento da concentração de cisteína. (B) Dependência linear da constante de velocidade com a concentração de cisteína em condições de pseudo-primeira ordem. (C) Espectros eletrônicos de absorção para as espécies MbFe(IV)=O , MbFe(III) , e o espectro eletrônico final obtido da reação de redução de $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MbFe(IV)=O com $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína em condição de $\text{pH} = 6,2$ e temperatura de 25°C ; a linha pontilhada indica comprimento de onda de 625 nm.

Conforme acima discutido, a espécie SulfMbFe(II) é o principal produto para a reação de redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína em condições ácidas e neutras e este processo de redução pode ser representado pela reação 2

onde RCHO = derivado oxidado da cisteína.

A constante de velocidade de segunda ordem, k_1 , para a redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína para levar à formação da espécies SulfMbFe(II) e à forma oxidada da cisteína como um aldeído¹⁰⁰ depende fortemente do pH do meio e de forma similar ao observado para a redução da espécie ferrilmioglobina pelos redutores ascorbato e clorogenato,⁵⁹ Figura 31. As reações de redução pela cisteína em pH ácido apresentaram aumento da velocidade de decaimento da espécie ferrilmioglobina com a diminuição do pH do meio, isto ocorre em maior extensão do que apenas o observado no processo de auto-redução da espécie MbFe(IV)=O, Figura 25. Desta forma, a observação do aumento da velocidade da reação de

redução com o decrescimento do pH depende do envolvimento da espécie ferrilmioglobina em um equilíbrio ácido-base,^{34,68} reação 1, com um pK_a de 4,9¹⁰¹ para a protonação da espécie $MbFe(IV)=O$ ao invés de apenas uma catálise ácida específica como o observado para o autodecaimento da ferrilmioglobina e para a autooxidação da oximioglobina.⁶⁸

Figura 31 - Constante de segunda ordem do processo de redução da espécie ferrilmioglobina pela cisteína em função do pH do meio à temperatura de 25 °C. A curva foi obtida através do ajuste não linear à Equação 9 com $r^2 = 0,9658$.

Em condições neutras, a protonação da His₄₈ e His₁₁₉ na cadeia polipeptídica da globina (Figura 32) aparenta aumentar a taxa de transferência de elétrons, como já reportado na literatura para a reação entre citocromo-C e oximioglobina.¹⁰²

Figura 32 - Estrutura cristalográfica da proteína metamioglobina do coração de cavalo. Figura gerada com auxílio do software WebLab ViewerLite a partir do número de identificação 1YMB depositado no *Protein Data Bank*.

Considerando todos os três grupos protolíticos envolvidos no processo de redução da espécie ferrilmioglobina, Esquema 7, a constante observada de pseudo-primeira ordem, k_{obs} (s^{-1}), para a formação da espécie sulfomíoglobina em função do pH do meio pode ser escrita segundo a equação:

$$k_{obs}^{sulfMbFe(II)} = \frac{(k_1^{3H^+} [H^+]^3 + k_1^{2H^+} [H^+]^2 K_{a1} + k_1^{H^+} [H^+] K_{a1} K_{a2} + k_1^N K_{a1} K_{a2} K_{a3})}{([H^+]^3 + [H^+]^2 K_{a1} + [H^+] K_{a1} K_{a2} + K_{a1} K_{a2} K_{a3})} \quad (9)$$

onde K_{a1} é a constante de dissociação ácida da espécie $MbFe(IV)=O, H^+$, K_{a2} é a constante de dissociação ácida da His_{48} e K_{a3} a constante de dissociação ácida para a His_{119} , como ilustra o Esquema 7.

Esquema 7 - Sugestão de esquema de reação para a redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína em condições ácidas e neutras. Através da dependência da reação com o pH do meio (Figura 30), o envolvimento das duas histidinas (His₄₈/His₁₁₉) da cadeia polipeptídica da globina em um equilíbrio ácido-base e sua participação na reação de redução é proposto.

O perfil de variação de k_2 com pH, Figura 31, é então descrito através do ajuste não linear da Equação 9 aos dados experimentais utilizando os valores de $pK_{a1} = 4,9$; $pK_{a2} \simeq 5,6$; $^{103} pK_{a3} \simeq 6,6$, 103 proporcionando a obtenção dos valores de $k_1^{3H^+} = (5,1 \pm 0,4) \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_1^{H^+} = (2,1 \pm 0,4) \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_1^N = (0,31 \pm 0,15) \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. O valor de $k_1^{2H^+}$ não foi satisfatoriamente determinado baseando-se no ajuste não linear da eq. (9) aos dados experimentais apresentados na Figura 31.

Para a reação em meio alcalino, $\text{pH} > 9$, onde o redutor é o diânion tiolato da cisteína com pK_a de 8,3 para o tiol e 10,4 para o grupo amino, o produto majoritário da reação 3 é a espécie oximioglobina (MbFe(II)O_2):

para qual o valor de $k_5 = (0,12 \pm 0,01) \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ é obtido para a reação conduzida em $\text{pH} = 9,0$ e a temperatura de 25°C .

A homocisteína juntamente com a glutathione foi comparada à cisteína na reação de redução da espécie ferrilmioglobina em condições de pH intermediário, $\text{pH} = 7,4$. Nestas condições, o principal produto de reação foi a espécie SulfMbFe(II), tanto para a redução pela cisteína como pela homocisteína e glutathione, como valores

de constante de velocidade de reação similares e parâmetros de ativação sem diferença significativa para os três redutores empregados, Tabela 4.

Tabela 4 - Constantes de velocidade de segunda ordem e valores de entropia e entalpia de ativação para a reação de redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína, homocisteína e glutathiona em tampão fosfato com força iônica de 0,16 e pH = 7,4

	$k_1/10^2 \text{ (L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$			$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$
	20,0°C	25,0°C	35,0°C	(kJ·mol ⁻¹)	(J mol ⁻¹ K ⁻¹)
cisteína	30,0 ± 1,0	72,0 ± 2	149,0 ± 3,0	75 ± 2	-250 ± 7
homocisteína	23,0 ± 0,3	70,0 ± 1	139,0 ± 5,0	89 ± 4	-251 ± 13
glutathiona	32,0 ± 0,1	79,0 ± 6	156,0 ± 7,0	77 ± 3	-248 ± 9

Como investigado anteriormente, a cisteína reduz a espécie MbFe(IV)=O com menor eficiência quando comparada ao redutor H₂S.¹⁰¹ Para a reação com o H₂S, a redução da espécie ferrilmioglobina apresentou constante de velocidade de 2,5 10⁶ L·mol⁻¹·s⁻¹ para condições de pH < 5 e à temperatura de 25 °C, enquanto que para a cisteína nesta mesma condição obteve-se o valor de $k_1^{3H^+} = (5,1 \pm 0,4) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Para a reação de redução da espécie ferrilmioglobina em condição de pH alcalino, a constante de velocidade reportada para a reação com o íon HS⁻ é de 1,0 10⁴ l·mol⁻¹·s⁻¹ à temperatura de 25 °C enquanto que para o diânion tiolato da cisteína, a constante de velocidade para a redução da espécie ferrilmioglobina é de (0,12 ± 0,01) L mol⁻¹ s⁻¹ à temperatura de 25°C. A reação de redução da espécie ferrilmioglobina pelo H₂S e pelo íon HS⁻ tem como produto de reação a espécie SulfMbFe(II) independentemente do pH do meio, entretanto, a reação com a cisteína tem como produto majoritário a espécie SulfMbFe(II) somente em condições de meio ácido e neutra e para valores de pH do meio reacional superiores ao pK_a do grupo tiol e do grupo amino da cisteína, o produto majoritário da redução é a espécie MbFe(II)O₂.

A oxidação via um elétron do H₂S resulta na formação dos radicais HS[•] e S[•], os quais sofrem subsequente reação de adição à dupla ligação do anel porfirínico da espécie MbFe(III) levando à formação da espécie SulfMbFe(II) como produto de reação.⁴⁴ Para a reação de redução da espécie ferrilmioglobina pela cisteína, apenas a forma protonada da cisteína pode levar a formação do radical HS[•] pelo rearranjo 1,2-hidrogênio como ilustrado no Esquema 8. Em condições de meio alcalino, o diânion da cisteína irá favorecer um rearranjo 1,3-hidrogênio ao invés de

1,2-hidrogênio promovendo assim a formação de um radical centrado em carbono terciário o qual é menos reativo e não produz $\text{HS}^\bullet$.¹⁰⁰ Para valores de $\text{pH} > 9$, meio alcalino, a espécie MbFe(II)O_2 é formada a partir da espécie MbFe(III) através de uma segunda reação de redução envolvendo também o diânion da cisteína. Os dois diferentes caminhos de reação para redução da espécie MbFe(IV)=O (e sua forma protonada, MbFe(IV)=O, H^+) pela cisteína e pelo diânion da cisteína estão ilustrados Esquema 8.

Esquema 8 - Proposta de mecanismo de reação para a redução da espécie MbFe(IV)=O pela cisteína em condições ácidas e alcalinas.

O aminoácido cisteína é reconhecido por proteger os rins dos danos causados pela ação tóxica da mioglobina quando este apresenta condições

patológicas de mioglobinúria que caracteriza-se pela presença de mioglobina na urina.⁹⁷ O mecanismo de ação da cisteína para a proteção renal nestas condições não é trivial, uma vez que a presença de outras espécies conhecidamente antioxidantes como o peptídeo glutathiona e o aminoácido homocisteína aparentemente podem agravar esta condição patológica na qual está envolvido também o peróxido de hidrogênio. A presença de mioglobina juntamente ao peróxido de hidrogênio pode promover a formação de espécies de ferro-heme hipervalentes, podendo assim estas espécies ser o agente danoso associado a patologia. A função da cisteína como agente inibidor de tal condição estaria no fato de que sob condições levemente ácidas, a mesma atuaria como agente redutor das espécies de ferro-heme hipervalentes levando à formação do pigmento sulfomioglobina, inativo, e prevenindo assim as modificações em estruturas lipídicas sensíveis à oxidação e especialmente inibindo o dano causado pela oxidação de proteínas que compõem as membranas celulares.

5.4. Conclusões

Frequentemente recomenda-se a adição de vegetais e frutas às refeições ricas em carne vermelha a fim de proteger o trato gastrointestinal dos danos causados pelos radicais formados a partir dos pigmentos da carne vermelha, espécies de ferro-heme, durante sua digestão. Um exemplo de redutor em frutas e vegetais é o ascorbato que é conhecido por reduzir a espécie de ferro-heme hipervalente ferrilmioglobina em sua forma protonada com constante de segunda ordem de $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que o clorogenato, um antioxidante comum em vegetais, é bem mais eficiente apresentando constante de reação de redução da espécie ferrilmioglobina de $3 \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à temperatura de 25°C.⁵⁹ A cisteína é menos eficiente quando comparada aos redutores citados anteriormente, porém apresenta relevância em condições biológicas, uma vez que a cisteína está presente em quantidade relevante em proteínas tais como a miosina.¹⁰⁴ Proteínas como a miosina estão fisicamente próximas à mioglobina podendo assim agir localmente efetuando a redução de

qualquer formação de espécies de ferro-heme hipervalentes durante o processamento da carne, bem como a sua digestão.

A reatividade dos compostos sulfurados, H_2S e cisteína, frente à espécie MbFe(IV)=O apresenta singularidades importantes. A velocidade de redução da espécie MbFe(IV)=O pelo H_2S é muito maior quando comparado à velocidade de redução apresentada pela cisteína, apresenta compensação de temperatura, e a formação da espécie SulfMbFe(IV)=O é observada em condições de meio alcalino o que não é observado para a cisteína. A formação da espécie SulfMbFe(II) poderia ser considerada como um produto final para as espécies reativas provenientes da atividade de pseudo-peroxidase da MbFe(III) , enquanto que a MbFe(II)O_2 formada pela redução por cisteína em meio alcalino ou por redutores tais como o ascorbato e o clorogenato realimenta o ciclo catalítico para a formação de espécies reativas em meio biológico.

Proteínas da carne tais como a miosina podem atuar como um agente de proteção interna contra os efeitos deletérios de espécies ferro-heme hipervalente, formado pela oxidação da mioglobina e hemoglobina por peróxido de hidrogênio, uma vez que a sulfomioglobina é resultante da redução pela cisteína durante a digestão. A formação da espécie sulfomioglobina como produto de reação previne a atividade catalítica das espécies ferro-heme funcionando desta forma como uma reação de terminação. Este fato é um claro contraste para antioxidantes derivados de frutas e vegetais tais como o ascorbato e o clorogenato que atuam reduzindo a espécie ferrilmioglobina às espécies de ferro-heme que podem ainda alimentar o ciclo de atividade de pseudo-peroxidase da mioglobina.

6. Conclusões Gerais

6. Conclusões Gerais

A reação de redução da espécie ferrilmioglobina pelas espécies H_2S e HS^- ocorre rapidamente levando à formação produto final a sulfomioglobina e a velocidade de sua formação depende de maneira não linear com a concentração hidrogeniônica do meio reacional. A reação de formação de sulfomioglobina depende basicamente de dois equilíbrios ácido-base, um referente à protonação da espécie MbFe(IV)=O e o outro equilíbrio envolvendo o H_2S . A reação em condição de pH na qual as espécies MbFe(IV)=O, H^+ e H_2S são majoritárias, $\text{pH} < 5$, apresentaram o maior valor de velocidade de formação do composto sulfomioglobina com $k_{\text{H}_2\text{S}, \text{MbFe(IV)=O, H}^+} = (2,5 \pm 0,1) 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Os menores valores de constante de velocidade são observados quando as concentrações das espécies MbFe(IV)=O e HS^- estão presentes majoritariamente no meio reacional em $\text{pH} > 7$, com $k_{\text{HS}^-, \text{MbFe(IV)=O}} = (1,0 \pm 0,7) 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A reação de redução da espécie MbFe(IV)=O pelo H_2S não apresentou variação apreciável com a temperatura, este comportamento é explicado pelo fenômeno de compensação com a temperatura que possibilita a compreensão do processo de *greening* mesmo em produtos cárneos condimentados armazenados à baixa temperatura.

A espécie perferrilmioglobina é reduzida pelo monóxido de carbono com constante de velocidade de segunda ordem de $(3,30 \pm 0,6) 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A reação se processa através da transferência de um átomo de oxigênio derivado do radical hidroperoxila formado no aminoácido triptofano para levar à formação como produto o CO_2 , que é identificado também em outras reações envolvendo a espécie triptofano hidroperóxido isolada e ativada por outras espécies de ferro livre nos estados de oxidação 3+ e 2+. A reação se processa em duas etapas formando primeiramente o radical alcóxido no aminoácido triptofano seguido de uma segunda transferência de elétrons.

As reações de redução da espécie ferrilmioglobina pelo aminoácido L-cisteína apresentam, assim como o H_2S , uma variação da constante de velocidade de segunda ordem com as condições hidrogeniônicas do meio reacional, da mesma forma que a espécie ferrilmioglobina em seu estado protonado também apresentou maior constante de velocidade de reação com constante de velocidade de segunda ordem de $k_1^{3\text{H}^+} = (5,1 \pm 0,4) \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. No entanto uma singularidade foi encontrada,

o produto majoritário formado em condições de pH básico é a espécie MbFe(II)O_2 e não a sulfomioglobina como determinado para o H_2S . A diferença entre o produto majoritário formado em meio ácido do produto majoritário em meio básico envolve a diferença do mecanismo de reação nestas condições. A reação em condições de pH ácido favorece a formação de um intermediário radicalar após a transferência de um elétron para a espécie MbFe(IV)=O que por rearranjo leva à formação do radical $\text{HS}^\bullet$ que reage com o anel porfirínico da heme proteína para formar a sulfomioglobina. A formação de sulfomioglobina apresenta dependência com o estado de protonação das histidinas His_{48} e His_{119} sendo a espécie mais reativa a espécie MbFe(IV)=O, H^+ que possui as duas histidinas em estado protonado. A espécie MbFe(IV)=O em que apenas uma histidina está protonada é mais reativa quando comparada às condições hidrogeniônicas que favorecem a protonação de ambas as histidinas.

O mecanismo de ação antioxidante das pequenas moléculas diatômicas H_2S e CO , bem como do amino ácido cisteína, é singular. O CO atua como seletivo e importante redutor do radical peroxila na cadeia polipeptídica da espécie perferrilmioglobina. Por sua vez, o H_2S e a cisteína, bem como seus peptídeos, atuam em meio ácido e neutro como importantes antioxidantes frente a espécie ferrilmioglobina levando a formação da espécie sulfomioglobina que é inativa na atividade de pseudoperoxidase da mioglobina. Estes diferentes mecanismos de ação, diferenciam o modo de atuação destes redutores presentes endogenamente nos alimentos e no meio biológico quando comparados a conhecidos antioxidantes fenólicos derivados de frutas e vegetais os quais atuam de modo a reduzir as espécies perferril- e ferrilmioglobina por um simples mecanismo de transferência de elétrons de esfera externa a longa distância formando por fim a espécie férrica da mioglobina que por sua vez é ativa no ciclo catalítico de atividade de pseudoperoxidase.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Exportações brasileiras de carne bovina**. 2013, disponível em: <http://www.abiec.org.br/41_exportacao_ano.asp> Acesso em: 01 out. 2014.
2. HUFF-LONERGAN E.; LONERGAN, S. M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v. 71, n. 1, p. 194-204, 2005.
3. SUMAN, S. P.; JOSEPH P. Myoglobin chemistry and meat color. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p.79-99, 2013
4. WOOD, J. D.; RICHARDSON, R.I.; NUTE, G.R.; FISHER, A. V.; CAMPO, M.M.; KASAPIDOU E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v. 66, n.1, p. 21-32, 2004.
5. EVANS, S. V.; BRAYER, G.D. High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. **Journal of Molecular Biology**, v. 213, n. 4, p. 885-897, 1990.
6. DAVIES, K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 48, n. 1, p. 41-47, 1999.
7. SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews** , v. 12, n.1, v. 376-390, 2013.
8. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. **Free radicals in biology and medicine**. NewYork: Oxford University , 2007. p. 888.
9. CARDOSO, D. R.; LIBARDI, S. H.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, n. 5, p. 487-502, 2012.
10. PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 47-62, 2010.
11. KOPPENOL, W. H. The basic chemistry of nitrogen monoxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 98, p. 385-391, 1998
12. BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.
13. GEBICKI, J. M.; NAUSER, T.; DOMAZOU, A.; STEINMANN, D.; BOUNDS, P. L.; KOPPENOL, W. H. Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance. **Amino Acids**, v. 39, n. 5, p. 1131-1137, 2010.

14. HEADLAM, H. A.; DAVIES, M. J. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 9, p. 1175 – 1184, 2004.
15. HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, n. 2-3, p. 196-219, 2001.
16. NETA, P.; HUIE, R. E.; ROSS, A. B. Rate constants for reactions of peroxy radicals in fluid solutions. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 19, n. 2, p.413-513 1990.
17. KELMAN, D.; DEGRAY, J. A.; MASON, R. P.; HILL, C.; CAROLINA, N. Myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7458-7463, 1994.
18. DEGRAY, J. A.; GUNTHER, M. R.; TSCHIRRET-GUTH R, MONTELLANO P.R.O; MANSON, R.P. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2359-2362, 1997.
19. IRWIN, J. A.; ØSTDAL, H.; DAVIES, M. J. Myoglobin-induced oxidative damage: evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, n. 1, p. 94-104, 1999.
20. SVISTUNENKO, D. A. Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1707, n. 1, p. 127-155, 2005.
21. KEILIN, D.; HARTREE, E. F. The combination between methæmoglobin and peroxides: hydrogen peroxide and ethyl hydroperoxide. **Proceedings of the Royal Society**, v. 117, p. 1-15, 1934.
22. GEORGE, P.; IVINE, D. H. The reaction between metmyoglobin and hydrogen peroxide. **Transactions of the Faraday Society**, v. 52, p. 511-517, 1952.
23. GEORGE, P.; IRVINE, D.H. A possible structure for the higher oxidation state of metmyoglobin. **The Biochemical Journal**, v. 60, n. 4, p. 596-604, 1955.
24. GIBSON, J.F.; INGRAM, D. J. E. Location of free electrons in porphyrin ring complexes. **Nature**, v. 178, p. 871-872, 1956.
25. GIBSON, J. F.; INGRAM, D.J.E.; NICHOLLS, P. Free radical produced in the reaction of metmyoglobin with hydrogen peroxide. **Nature**, v. 181, p. 1398-1399, 1958.
26. KELSO KING, N.; WINFIELD, M. E. The Mechanism of metmyoglobin oxidation the mechanism of metmyoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 1520-1528, 1963.
27. KELSO KING, N.; LOONEY, F. D.; WINFIELD, M. E. Amino acid free radical in oxidized metmyoglobin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 133, p. 65-82, 1967.

28. MATSUI, T.; OZAKI, S.; LIONG E.; PHILLIPS, G. N.; WATANABE, Y. Effects of the location of distal histidine in the reaction of myoglobin with hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2838-2844, 1999.
29. WITTING, P. K.; MAUK, A. G. Reaction of human myoglobin and H₂O₂. Electron transfer between tyrosine 103 phenoxyl radical and cysteine 110 yields a protein-thiyl radical. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16540-16547, 2001.
30. RAO, S. I.; WILKS, A.; HAMBERG, M.; MONTELLANO, P. R. O. The lipooxygenase activity of myoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 7210-7216, 1994.
31. JØRGENSEN, L. V.; ANDERSEN, H. J.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of reduction of hypervalent iron in myoglobin by crocin in aqueous solution. **Free Radical Research**, v. 27, n. 1, p. 73 – 87, 1997.
32. JONGBERG, S.; LUND, M. N.; ØSTDAL, H.; SKIBSTED, L. H. Phenolic antioxidant scavenging of myosin radicals generated by hypervalent myoglobin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 48, 12020-12028, 2012.
33. CARLSEN, C. U.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.
34. MIKKELSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin : product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 200, p. 171-177, 1995.
35. DAVIES, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9895-9901, 1987.
36. CIRCU, M. L.; TAKYEE, A. W. Redox biology of the intestine. **Free Radical Research**, v. 45, p. 1245-1266, 2011.
37. REDDIE, K. G.; CARROLL, K. S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 6, p. 746-754, 2008.
38. TAJC, S. G.; TOLBERT, B. S.; BASAVAPPA, R.; MILLER, B. L. Direct determination of thiol pKa by isothermal titration microcalorimetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 34, p.10508-10509, 2004.
39. SZAJEWSKI, R. P.; WHITESIDES, G. M. Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 6, p. 2011-2026, 1980.
40. MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.
41. FUKUTO, J. M.; CARRINGTON, S. J.; TANTILLO, D. J.; HARRISON, J. G.; IGNARRO LJ, FREEMAN B.; CHEN, A.; WINK, D.A. Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of

carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 769-793, 2012.

42. HEROLD, S.; REHMANN, F. K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 531-545, 2003.

43. NICOL, D. J.; SHAW, M. K.; LEDWARD, D. Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef. **Applied Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 937-939, 1970.

44. ROMÁN-MORALES, E.; PIETRI, R.; RAMOS-SANTANA, B.; VINOGRADOV, S. N.; LEWIS-BALLESTER, A.; LÓPEZ-GARRIGA, J. Structural determinants for the formation of sulfhemeprotein complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 4, p. 489-492, 2010.

45. BREWER, S. Irradiation effects on meat color-a review. **Meat Science**, v. 68, n. 1, p. 1-17, 2004.

46. PIETRI, R.; ROMÁN-MORALES, E.; LÓPEZ-GARRIGA, J. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 393-404, 2011.

47. LI, L.; ROSE, P. MOORE, P. K. Hydrogen sulfide and cell signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 169-187, 2011.

48. MAGEE, E.; RICHARDSON, C. J.; HUGHES, R.; CUMMINGS, J. H. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, 1488-1494, 2000.

49. FLORIN, T.; NEALE, G.; GIBSON, G. R. Metabolism of dietary sulphate : absorption and excretion in humans. **Gut**, v. 32, p. 766-773, 1991.

50. WALLACE, J. L. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 9, p. 1125-1133, 2010.

51. KASHFI, K. Anti-cancer activity of new designer hydrogen sulfide-donating hybrids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 5, p. 831-846, 2014.

52. NICHOLLS, P. The formation and properties of sulphmyoglobin and sulphcatalase. **Biochemical Journal**, v. 81, p. 374-383, 1961.

53. BERZOFSKY, J. A.; PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E. Sulfheme proteins : I. Optical and magnetic properties of sulfmyoglobin and its derivatives.. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 10, p. 3367-3377, 1971.

54. BERZOFSKY, J. A.; PEISACH, J. Sulfheme proteins: II. The reversible oxigenation of ferrous sulfmyoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 7366-7372, 1971.

55. BERZOFSKY, J. A.; PEISACH, J.; ALBEN, J. O. Sulfheme proteins : III . Reaction between electron withdrawal from iron and ligand binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3774-3782, 1972.
56. BERZOFSKY, J. A.; PEISACH, J.; HORECKER, B. L. Sulfheme Proteins: IV. The stoichiometry of sulfur incorporation and the isolation of sulfhemin, the prosthetic group of sulfmyoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3783-3791, 1972.
57. KEILIN, A. D. On the combination of methaemoglobin with H₂S combination of methemoglobin. **Proceedings of the Royal Society**, v. 113, n. 784, p. 393-404, 2014.
58. MOREL, D.B.; CHANG Y. The Structure of the Chromophore of Sulphmyoglobin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.136, p. 121-130, 1967.
59. CARLSEN, C. U.; KRÖGER-OHLSSEN, M. V.; BELLIO, R.; SKIBSTED, L.H.; Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin by chlorogenate and ascorbate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 204-212, 2000.
60. PINDSTRUP, H.; FERNÁNDEZ, C.; AMIGO, J. M.; SKIBSTED, L. H. Multivariate curve resolution of spectral data for the pH-dependent reduction of ferrylmyoglobin by cysteine. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 78 – 83, 2013.
61. SHEN, X.; PATTILLO, C. B.; PARDUE, S.; BIR, S. C.; WANG, R.; KEVIL, C. G. Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1021-1031, 2011.
62. FOGO, J. K.; POPOWSKY, M. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. **Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 732-734, 1949.
63. HERSLETH, H.P.; HSIAO, Y.W.; RYDE, U.; GÖRBITZ, C. H.; ANDERSSON, K. K. The crystal structure of peroxymyoglobin generated through cryoradiolytic reduction of myoglobin compound III during data collection. **The Biochemical Journal**, v. 412, n. 2, p. 257-264, 2008.
64. GUNTHER, M.R.; TSCHIRRET-GUTH, R.A.; WITKOWSKA, H.E.; FANN, Y.C.; BARR, D.P.; ORTIZ De MONTELLANO P. R. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide. **The Biochemical Journal**, v. 330, p.1293-1299, 1998.
65. SVISTUNENKO, D. A. An EPR study of the peroxy radicals induced by hydrogen peroxide in the haem proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1546, n. 2, p. 365-378, 2001.
66. RÍOS-GONZÁLEZ, B. B.; ROMÁN-MORALES, E. M.; PIETRI, R.; LÓPEZ-GARRIGA, J. Hydrogen sulfide activation in hemeproteins: the sulfheme scenario. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 133, p. 78-86, 2014.
67. BASIS, T. M.; JUNE, R. Structure of a stable form sulfheme. **Biochemistry**, v. 25, p. 8458-8466, 1986.

68. ANDERSEN, H. J.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Salt effect on acid-catalyzed autoxidation of oxymyoglobin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. A42, p. 226-236, 1988.
69. HARGROVE, M. S.; SINGLETON, E. W.; QUILLING, M.L.; ORTIZ, A. L.; PHILLIPS, G. L.; OLSON, J. S. His64(E7)-Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of heme dissociation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4207-4214, 1994.
70. BRODERIUS, S. J.; SMITH, L. L. Direct Determination and calculation of aqueous hydrogen sulfide. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 424-428, 1977.
71. BRØNNUM, B.; JOHANSEN, H. S.; SKIBSTED, L. H. Ammine ligand exchange in tetraamminegold (III) in aqueous solution. composition of transition states and relative reactivity of tetraamminegold (III) and its conjugated base, amidotriamminegold (III). **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 1859-1862, 1988.
72. MAYER, J. M. Proton-coupled electron transfer: a reaction chemist's view. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 363-390, 2004.
73. MAINES, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 517-554, 1997.
74. GIBBONS, S. J.; VERHULST P.J.; BHARUCHA A.; FARRUGIA G. Review article: carbon monoxide in gastrointestinal physiology and its potential in therapeutics. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 38, n. 7, p. 689-702, 2013.
75. GIBBONS, S. J.; FARRUGIA, G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. **The Journal of Physiology**, v. 556, p. 325-336, 2004.
76. BERNE, J.; LAUZIER, B.; ROCHETTE L.; VERGELY, C. Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury *in vitro* via antioxidant properties. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 475-484, 2012.
77. TAKAGI, T.; NAITO, Y.; TSUBOI, H.; ISOZAKI, Y.; KATADA, K.; SUZUKI, T.; et al. Increased intestinal luminal carbon monoxide gas in patients with ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics Symposium Series**, v. 2, n.1, p. 233-238, 2006.
78. FEEN, W. O.; COBB, D.M. The burning of carbon monoxide by heart and skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 102, p. 393-401, 1932.
79. BICKAR, D.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J. Carbon monoxide-driven reduction of ferric heme and heme proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 17, p. 10777-10783, 1984.
80. YOUNG, L. J.; CAUGHEY, W. S. Autoreduction phenomena of bovine heart cytochrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 31, p. 15019-15025, 1987.
81. YOUNG, L. J.; CAUGHEY, W. S. Mitochondrial oxygenation of carbon monoxide. **The Biochemical Journal**, v. 239, n. 1, p. 225-227, 1986.

82. SAWANO, M.; SHIMOUCHI A. A tracer analysis study on the redistribution and oxidization of endogenous carbon monoxide in the human body. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 47, n. 2, p. 107-110, 2010.
83. BARLEY, M. H.; MEYER, T. J. Electrocatalytic reduction of nitrite to ammonia based on a water-soluble iron porphyrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 19, p. 5876-5885, 1986.
84. UEMI, M.; RONSEIN, G. E.; PRADO, F. M.; MOTTA, D.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS M. H. G.; Di MASCIO, P. Cholesterol hydroperoxides generate singletmolecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$]: near-IR emission, ^{18}O -labeled hydroperoxides, and mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 887-895, 2011.
85. GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, n. 2, p. 149-155, 1999.
86. SY, C.; CARIS-VEYRAT, C.; DUFOUR, C.; BOUTALEB, M.; BOREL, P.; DANGLES, O. Inhibition of iron-induced lipid peroxidation by newly identified bacterial carotenoids in model gastric conditions: comparison with common carotenoids. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 698-712, 2013.
87. HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radical Research**, v. 33, n. 6, p. 819-830.
88. RONSEIN, G. E.; OLIVEIRA, M. C. B.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$]: mechanistic studies using ^{18}O -labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 1271-1283, 2008.
89. DENISOV, E.T.; SHESTAKOV, A. F. Reactions of alkoxy and peroxy radicals with carbon monoxide. **Kinetics and Catalysis**, v. 49, n. 1, p. 1-10, 2011.
90. FIELDING, A. J.; SINGH, R.; BOSCOLO, B.; LOEWEN, P. C.; GHIBAUDI, E. M.; IVANCICH, A. Intramolecular electron transfer versus substrate oxidation in lactoperoxidase: investigation of radical intermediates by stopped-flow absorption spectrophotometry and (9-285 GHz) electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 47, v. 37, p. 9781-9792, 2008.
91. CARLSEN, C.U.; SKOVGAARD, I.M.; SKIBSTED, L. H. Pseudoperoxidase activity of myoglobin: kinetics and mechanism of the peroxidase cycle of myoglobin with H_2O_2 and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5815-5823, 2003.
92. BARON, C. P.; ANDERSEN, H. J. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3887-3897, 2002.
93. KRÖGER-OHLSSEN, M. V.; ØSTDAL, H.; ANDERSEN, M. L. The effect of pH on the oxidation of bovine serum albumin by hypervalent myoglobin species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, n. 2, p. 202-208, 2003.

94. ISHIKAWA, S.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 8, p. 1182-1191, 2010.
95. ROMERO, F. J.; ORDONEZ, I.; ARDUINI, A.; CADENAS E. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1680-1688, 1992.
96. CHATFIELD, M. J., LAMAR, N. G.; KAUTEN, R. J. Proton NMR characterization of isomeric sulfmyoglobins: preparation, interconversion, reactivity patterns, and structural features. **Biochemistry**, v. 26, n. 22, p. 6939-6950, 1987.
97. ZAGER, R. A.; BURKHART, K. M. Differential effects of glutathione and cysteine on Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 and myoglobin-induced proximal tubular cell attack. **Kidney International**, v. 53, n. 6, p. 1661-1672, 1998.
98. RUCKEBUSCH, C.; BLANCHET, L. Multivariate curve resolution: a review of advanced and tailored applications and challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 28-36, 2013.
99. CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6602-6606, 2004.
100. NAUSER, T.; KOPPENOL, W. H.; SCHÖNEICH, C. Reversible hydrogen transfer reactions in thiyl radicals from cysteine and related molecules: absolute kinetics and equilibrium constants determined by pulse radiolysis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 18, p. 5329-5341, 2012.
101. POSTNIKOVA, G. B.; SIVOZHELEZOV, V.S.; TSELIKOVA, S. V. Controlling the electron transfer rate between oxymyoglobin and ferricytochrome C by alterations in the myoglobin contact site . The role of histidines and electrostatic and steric interactions in the mechanism of the reaction. **Molecular Engineering**, v. 4, p. 431-449, 1995.
102. KAO, Y.; FITCH C. A.; BHATTACHARYA, S.; SARKISIAN, C. J.; LECOMTE, J. T. J.; GARCÍA-MORENO B. Salt effects on ionization equilibria of histidines in myoglobin. **Biophysical Journal**, v. 79, p. 1637-1654, 2000.
103. LIBARDI, S. H. PINDSTRUP, H. CARDOSO, D. R. SKIBSTED, L. H. Reduction of ferrylmyoglobin by hydrogen sulfide. Kinetics in relation to meat greening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, 2883-2888, 2013.
104. LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6992-6997, 2003.

Apêndice A - Constantes de velocidade de segunda ordem em diferentes condições de pH para a reação entre a espécie ferrilmioglobina e o H_2S à temperatura de 25 °C. Os dados foram utilizados para a geração do gráfico da Figura 13

pH	k_2 ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
3,1	$(2,5 \cdot 10^6 \pm 0,1)$
4,1	$(2,2 \cdot 10^6 \pm 0,1)$
5,0	$(1,9 \cdot 10^6 \pm 0,1)$
5,5	$(9,4 \cdot 10^5 \pm 0,5)$
6,2	$(3,4 \cdot 10^5 \pm 0,1)$
6,9	$(2,1 \cdot 10^5 \pm 0,1)$
8,0	$(3,3 \cdot 10^4 \pm 0,2)$
9,0	$(4,0 \cdot 10^3 \pm 0,1)$

Apêndice B - Valores experimentais para a constante de velocidade de segunda ordem para a reação entre a espécie ferrilmioglobina e a cisteína à temperatura de 25 °C. Os dados foram utilizados para a geração do gráfico da Figura 31

pH	K_1 ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
4,5	$(3,42 \pm 0,27)$
5,0	$(2,30 \pm 0,06)$
5,6	$(0,89 \pm 0,04)$
6,0	$(1,08 \pm 0,01)$
6,2	$(1,20 \pm 0,04)$
7,0	$(0,95 \pm 0,05)$
7,4	$(0,36 \pm 0,01)$
8,2	$(0,37 \pm 0,02)$

Apêndice C- Constantes de velocidade para a auto-redução da espécie ferrilmioglobina em diferentes condições de pH e da auto redução da espécie perferrilmioglobina à temperatura de 25 °C

pH	$k_{\text{auto-redução}} (\text{s}^{-1})$	Espécie
4,5	$(6,40 \pm 0,05) 10^{-2}$	Ferrilmioglobina
5,0	$(4,5 \pm 0,06) 10^{-2}$	
5,6	$(3,21 \pm 0,05) 10^{-2}$	
6,2	$(1,25 \pm 0,06) 10^{-2}$	
6,5	$(1,26 \pm 0,06) 10^{-4}$	
7,0	$(6,70 \pm 0,4) 10^{-5}$	
7,4	$(5,41 \pm 0,4) 10^{-5}$	
8,2	$(6,03 \pm 0,5) 10^{-5}$	Perferrilmioglobina
7,4	$(2,60 \pm 0,1) 10^{-1}$	

Apêndice D - Constantes de velocidade para a reação entre diferentes espécies de ferrilmioglobina com o H_2S , o CO e a cisteína à temperatura de 25 °C

Espécie	$k_2 (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$
$\text{H}_2\text{S} / \text{MbFe(IV)=O}, \text{H}^+$	$(2,5 \pm 0,1) 10^6$
$\text{H}_2\text{S} / \text{MbFe(IV)=O}$	$(4,0 \pm 0,7) 10^5$
$\text{HS}^- / \text{MbFe(IV)=O}$	$(1,0 \pm 0,7) 10^4$
$\text{HS}^- / \text{MbFe(IV)=O}, \text{H}^+$	$(3,2 \pm 0,5) 10^7$
$\text{cisH} / (\text{HisH}^+, \text{HisH}^+) \text{-MbFe(IV)=O}, \text{H}^+$	$(5,1 \pm 0,4)$
$\text{cisH} / (\text{HisH}^+, \text{His}) \text{-MbFe(IV)=O}$	$(2,1 \pm 0,4)$
$\text{cisH} / (\text{His}, \text{His}) \text{-MbFe(IV)=O}$	$(0,31 \pm 0,15)$
$\text{Cis}^{2-} / \text{MbFe(IV)=O}$	$(0,12 \pm 0,01)$
$\text{CO} / \bullet \text{MbFe(IV)=O}$	$(3,30 \pm 0,6) 10^2$