

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Gustavo Alfonso Cifuentes Colorado

**Função de resíduos do sítio de ligação do FAD da salicilato hidroxilase sobre
a sua capacidade de ligação, catálise e formação de produtos**

Belo Horizonte

2023

Gustavo Alfonso Cifuentes Colorado

**Função de resíduos do sítio de ligação do FAD da salicilato hidroxilase sobre
a sua capacidade de ligação, catálise e formação de produtos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

C718f
2023
D Colorado, Gustavo Alfonso Cifuentes.
Função de resíduos do sítio de ligação do FAD da salicilato hidroxilase sobre a sua capacidade de ligação, catálise e formação de produtos [manuscrito] / Gustavo Alfonso Cifuentes Colorado. 2023.
92 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Tiago Antônio da Silva Brandão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Bibliografia: f. 66-70.

Anexos: f. 71-92.

1. Química orgânica – Teses. 2. Mutagênese química – Teses. 3. Água oxigenada – Teses. 4. Cinética química – Teses. 5. Fluorimetria – Teses. 6. Salicilatos – Teses. 7. Catálise – Teses. 8. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – Teses. 9. Biorremediação – Teses. 10. Pseudomonas – Teses. 11. Espectroscopia de ultravioleta – Teses. 12. Termodinâmica – Teses. I. Brandão, Tiago Antônio da Silva, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Função de Resíduos do Sítio de Ligação do FAD da Salicilato Hidroxilase sobre a sua Capacidade de Ligação, Catálise e Formação de Produto"****Gustavo Alfonso Cifuentes Colorado**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão - Orientador
UFMGProf. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMGProf. Willian Ricardo Rocha
UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antonio da Silva Brandao, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2023, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Willian Ricardo Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2023, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 08/02/2024, às 06:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Maria Helena de Araujo, Subcoordenador(a)**, em 09/02/2024, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2911629** e o código CRC **4D3234A4**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque nele vivemos, nos movemos e existimos.

Ao professor Tiago Brandão, por acreditar em mim e se emocionar com cada novo resultado, pelas conversas e ensinamento ao longo desses anos que trabalhamos juntos.

A mi familia por todo su amor y compañía, por siempre alentarme a seguir mis sueños. A mi mamá María del Rosario, por sus mensajes de aliento, a mi papá Gustavo Alfonso por enseñarme que siempre hay que trabajar por lo que queremos, a mis hermanos Alejandra María, Juan José y a mi primo Mateo por acompañarme en este camino, a mi novia Viviana por todo el apoyo, amor y compañía, contigo esta experiencia fue más bonita.

A mis abuelas Margarita y Leida por siempre estar tan pendientes, ser mis maestras de vida y mostrarme un amor único. A mi tía Adriana por ayudarme a ver el mundo con sensatez y ser mi compañera de aventuras, a mis tías Ana María y Cristina por todo el amor.

A mis amigos y familia en Brasil por acogerme y hacerme sentir en una Colombia a 7000 km de distancia. A Manuel, Manuela y Alfonso mis primeros roomies. A Juliana, Alix y Valeria por siempre estar pendientes de mí. Estaré de corazón siempre agradecido con ustedes.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Macromol pelo companheirismo em especial a meus professores de português Diego minha companhia na linha 2, a Lucas e Ana por ensinar-me novas formas de ver o mundo, e pelas nossas conversas profundas e outras nem tanto.

Aos membros da banca examinadora, titulares e suplentes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

À Capes, INCT-Catálise/CNPq, Fapemig e a UFMG pelo apoio financeiro.

“Imposible nada es. Difícil, muchas cosas son”

Yoda

RESUMO

A salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* é uma flavoenzima FAD-dependente da via de degradação do naftaleno que catalisa a descarboxilação oxidativa de salicilato em catecol, dióxido de carbono e água, com consumo de NADH e oxigênio molecular. A catálise envolve um intermediário flavina-hidroperóxido do FAD, o qual, junto com um resíduo de histidina conservado (H226) tem um papel central na conversão do salicilato. Outros resíduos conservados próximos do sítio de ligação do FAD e do salicilato são E38, D314 e R111. Neste trabalho, avaliou-se os efeitos termodinâmicos e cinéticos de mutações sítio-dirigidas E38A, D314A e R111Q em relação à capacidade de ligação do FAD e a catálise da descarboxilação oxidativa do salicilato. As energias livres de Gibbs de ligação para o FAD foram determinadas a partir das constantes de dissociação (K_d) dos complexos E.FAD determinadas utilizando titulações fluorométricas. O valor de K_d de 0,036 μM para a NahG nativa corresponde a um ΔG° de -10,2 kcal mol⁻¹ a 25 °C, que não sofre qualquer alteração pela mutação R111Q ($K_d = 0,034 \mu\text{M}$), sugerindo que este resíduo não tem um papel aparente na ligação do FAD, em contraste com observações estruturais que sugerem fortes ligações de hidrogênio entre o resíduo R111 e o grupo fosforila do FAD. As mutações E38A e D314A resultam em valores de K_d mais elevados, 8,94 e 4,71 μM , respectivamente, que correspondem a valores de energias livres de formação dos complexos E.FAD mais fracos em 3,3 e 2,9 kcal mol⁻¹, respectivamente, quando comparados com a enzima nativa. Estes resultados sugerem que os resíduos E38 e D314 contribuem juntos em 6,2 kcal mol⁻¹, aproximadamente 60% da energia total de ligação do FAD na enzima nativa. Nos estudos cinéticos das mutantes observou-se um efeito significativo de cerca de 1800 vezes em k_{cat} devido à mutação R111Q e deslocamento total no particionamento da espécie flavo-hidroperóxido para a via desacoplada que conduz a produção de H₂O₂ sem qualquer conversão no substrato (via acoplada). Sugerindo que o resíduo R111 deve favorecer uma conformação aberta, onde o grupo isoaloxazina do FAD encontra-se ativo para redução pelo NADH e oxigenação, mas incapaz de produzir a conversão do substrato, que ocorre em uma conformação fechada de acordo com dados estruturais. O efeito conjunto de 1,6 kcal mol⁻¹ a 25 °C dos resíduos E38 e D314 representa cerca de 10% da energia livre de Gibbs de ativação para k_{cat} . Esses efeitos refletem parcialmente na capacidade da enzima em estabilizar a espécie flavo-hidroperóxido e realizar a conversão do substrato. Por fim, para a determinação da proporção de via desacoplada em relação a via acoplada, desenvolveu-se um novo método cinético que tem como vantagem em relação a métodos colorimétricos a possibilidade de determinar a proporção das vias dentro dos primeiros 10% de oxidação do NADH.

Palavras-chave: Mutagênese sítio-dirigida, truncamento, descarboxilação oxidativa, peróxido de hidrogênio, cinética, fluorimetria

ABSTRACT

Salicylate hydroxylase (NahG) from *Pseudomonas putida* is a FAD-dependent flavoenzyme of the naphthalene degradation pathway that catalyzes the oxidative decarboxylation of salicylate into catechol, carbon dioxide and water, with consumption of NADH and molecular oxygen. Catalysis involves a flavin-hydroperoxide intermediate of FAD, which, together with a conserved histidine residue (H226) plays a central role in salicylate conversion. Other conserved residues near to the FAD and salicylate binding sites are E38, D314 and R111. Herein, the thermodynamic and kinetic effects of site-directed mutations E38A, D314A and R111Q were evaluated in relation to FAD binding capacity and catalysis of the salicylate oxidative decarboxylation. The binding Gibbs free energies for FAD were determined from the dissociation constants (K_d) of the E.FAD complexes determined using fluorometric titrations. The K_d value of 0.036 μM for the native NahG corresponds to a ΔG° of $-10.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ at 25 °C, which is not altered by the R111Q mutation ($K_d = 0.034 \mu\text{M}$), suggesting that this residue has not an apparent role in FAD binding in contrast to structural observations that suggest strong hydrogen bonds between residue R111 and the phosphoryl group of FAD. The E38A and D314A mutations result in higher K_d values, 8.94 and 4.71 μM , respectively, which correspond to weaker E.FAD complexes by 3.3 and 2.9 kcal mol^{-1} , respectively, when compared to the native enzyme. These results suggest that residues E38 and D314 together contribute with 6.2 kcal mol^{-1} , approximately 60% of the total binding energy of FAD in the native enzyme. In the kinetic studies of the mutants, a significant effect of approximately 1800 times on k_{cat} was observed due to the R111Q mutation and a total shift in the partitioning of the flavohydroperoxide species to the uncoupled pathway that leads to the production of H_2O_2 without any conversion of the substrate (coupled pathway). Suggesting that residue R111 may favor an open conformation, where the isoalloxazine group of FAD is active for reduction by NADH and oxygenation, but unable to produce substrate conversion, which requires a closed conformation according to structural data. The joint effect of 1.6 kcal mol^{-1} at 25 °C of residues E38 and D314 represents about 10% of the Gibbs free energy of activation for k_{cat} . These effects partially reflect on the enzyme's ability to stabilize the flavohydroperoxide species and its capacity to carry out substrate conversion. Finally, to determine the proportion between the uncoupled and coupled pathways, a new kinetic method was developed, which has the advantage over colorimetric methods of being able to determine the proportion of pathways within the first 10% of NADH oxidation.

Keywords: Site-directed mutagenesis, truncation, oxidative decarboxylation, hydrogen peroxide, kinetics, fluorimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Espécies de oxigênio eletrofílicas ativadas mais comuns em monooxigenases.....	20
Figura 2 Reações envolvidas na ativação do oxigênio em monooxigenases dependentes de flavina	22
Figura 3 Representação esquemática das reações catalisadas por FPMOs.....	25
Figura 4 Degradação do naftaleno em <i>Pseudomonas putida</i> G7	27
Figura 5 Etapas reacionais e mecanismo de descarboxilação oxidativa do salicilato (I) em catecol (II) via S_EAr catalisada pela salicilato hidroxilase, utilizando FAD como cofator	29
Figura 6 Fenda de ligação do FAD em diferentes conformações em flavoproteínas.....	31
Figura 7 Truncamento do FAD em diferentes espécies	32
Figura 8 Titulações fluorométricas da NahG nativa e mutante R111Q com FAD	42
Figura 9 Posição de resíduos de triptofano na estrutura da <i>apo</i> NahG determinada por difração de raios-X	43
Figura 10 Titulações fluorométricas das variantes E38A e D314A da NahG com FAD	46
Figura 11 Correção do efeito de filtro interno nas titulações fluorométricas de uma solução de triptofano (a) e para a mutante E38A (b) com FAD	49
Figura 12 constantes de Michaelis. O K_m se assemelha a constante de equilíbrio para a formação de $E \bullet S$ e a catalise resultante.	50
Figura 13 Perfis cinéticos das variantes (a) E38A, (b) R111Q e (c) D314A em função da concentração de FAD, salicilato e NADH na conversão de salicilato em catecol	52
Figura 14 Espectros de UV-Vis dos cromóforos salicilato e NADH. Os espectros foram determinados em água a pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Fonte: O autor.	60
Figura 15 Determinação da proporção de via acoplada da NahG por um método cinético ..	61

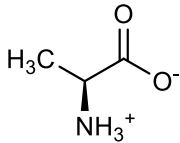
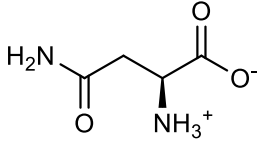
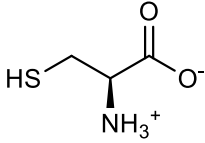
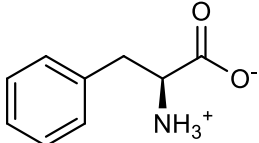
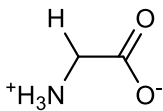
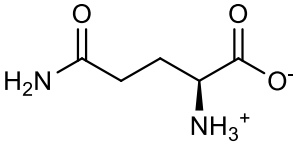
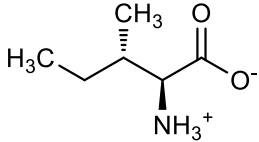
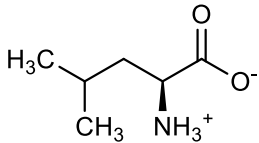
LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das monooxigenases dependentes de flavina (FPMO).....	24
Tabela 2 Constantes de dissociação (K_d) e energias livres de ligação (ΔG°) dos complexos Enzima-FAD para NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A.....	45
Tabela 3 Valores de K_m e energias-livres de Gibbs (ΔG_{EL}) para $1/K_m$ para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A.....	53
Tabela 4 Constantes catalíticas para a atividade oxidase e energias-livres de Gibbs correspondentes para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A.....	54
Tabela 5 Quantidade de H_2O_2 (em %), constantes de velocidade das vias acopladas e desacopladas e energias-livres de Gibbs correspondentes a estas etapas para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A.....	55
Tabela 6 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG nativa na presença de FAD e salicilato para avaliar a extensão de reação improdutiva.....	62
Tabela 7 Fator de reação produtiva (χ_{cp}) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG nativa na presença de FAD e salicilato.....	63

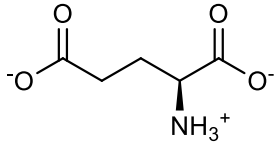
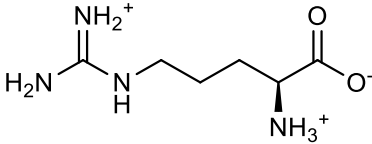
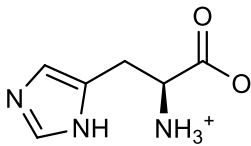
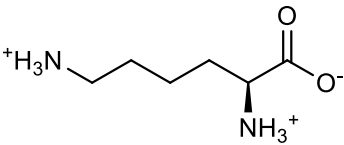
LISTA DE ABREVIATURAS

HAPs	–	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
FPMOs	-	Monooxigenases dependentes de flavina
NCBI	-	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
bp	-	Pares de base
FAD	-	Dinucleótido de Flavina e Adenina
NADH	-	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, forma reduzida
NAD ⁺	-	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, forma oxidada
ON	-	Oxigenação nucleofílica
EM	-	Oxigenação eletrofílica
FMN	-	Mononucleótido de Flavina
FMNH ₂	-	Mononucleótido de Flavina, forma reduzida
NahG	-	salicilato hidroxilase de <i>Pseudomonas putida</i>
EC	-	Número da comissão enzimática
S _E AR	-	Substituição Eletrofílica Aromática
ADP	-	Adenosina difosfato
AMP	-	Adenosina monofosfato
LB	-	Luria-Bertani
IPTG	-	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
rpm	-	Rotação por minuto
MWCO	-	Limite de peso molecular, do inglês <i>Molecular weight cutoff</i>
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetra-acético
UV-Vis	-	Ultravioleta-Visível
RET	-	Transferência ressonante de energia, do inglês <i>Resonance energy transfer</i>

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Nome	Abreviaturas	Estrutura (em pH 7)	pK _a α-CO ₂ H	pK _a α-NH ₃	pK _a cadeia lateral
Alanina	Ala, A		2,34	9,69	-
Asparagina	Asn, N		2,02	8,80	-
Cisteína	Cys, C		1,96	10,28	8,18
Fenilalanina	Phe, F		1,83	9,13	-
Glicina	Gly, G		2,34	9,60	-
Glutamina	Gln, Q		2,17	9,13	-
Isoleucina	Ile, I		2,36	9,60	-
Leucina	Leu, L		2,36	9,60	-

Metionina	Met, M		2,28	9,21	-
Prolina	Pro, P		1,99	10,60	-
Serina	Ser, S		2,21	9,15	-
Tirosina	Tyr, Y		2,20	9,11	10,07
Treonina	Thr, T		2,09	9,10	-
Triptofano	Trp, W		2,83	9,39	-
Valina	Val, V		2,32	9,62	-
Aspartato	Asp, D		1,88	9,60	3,65

Glutamato	Glu, E		2,19	9,67	4,25
Arginina	Arg, R		2,17	9,04	12,48
Histidina	His, H		1,82	9,17	6,00
Lisina	Lys, K		2,18	8,95	10,53

Fonte: (JOHN MCMURRY, 2008)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	17
1.2	BIORREMEDIAÇÃO.....	18
1.3	MONOOXIGENASES FLAVODEPENDENTES	20
1.3.1	Classificação das monooxigenases dependentes de flavina	23
1.3.2	Degradação de naftaleno por <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	26
1.3.3	Salicilato hidroxilase	28
1.4	JUSTIFICATIVA	33
1.4.1	Objetivo geral	34
1.4.2	Objetivos específicos	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS MUTANTES SIMPLES DE NAHG E38A, D314A E R111Q.....	35
2.1.1	Expressão dos mutantes E38A, D314A e R111Q da NahG.....	35
2.1.2	Purificação dos mutantes E38A, D314A e R111Q da NahG por cromatografia de afinidade e exclusão molecular	36
2.2	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO DO COFATOR NA NAHG POR FLUORIMETRIA.....	37
2.3	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_M E K_{CAT} DO SUBSTRATO E COFADORES DA NAHG POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	38
2.4	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO FORMADO NA REAÇÃO CATALISADA PELA NAHG.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO DE COFADORES DA NAHG POR FLUORIMETRIA.....	41
3.1.1	Correção de efeito de filtro interno	48
3.2	DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_M E K_{CAT} DO SUBSTRATO E COFADORES POR ESPECTROSCOPIA UV- VIS	50
3.2.1	Método cinético para a determinação de H_2O_2 na via improdutiva.....	59
4	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

O petróleo, conhecido como “óleo de rocha” por ser extraído de reservatórios subterrâneos, é uma mistura complexa composta majoritariamente por hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, além de compostos orgânicos contendo heteroátomos como enxofre, oxigênio ou nitrogênio, entre outros constituintes organometálicos complexados principalmente com vanádio e níquel (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003; WALTERS, 2020).

O conhecimento da composição do petróleo permite refinamentos otimizados para a conversão do petróleo cru em produtos de alto valor (SPEIGHT, 2015). A principal aplicação histórica dos derivados de petróleo foi na iluminação e lubrificação. Atualmente, o petróleo bruto é utilizado na produção de gasolina, diesel, combustível de aviação, óleo de aquecimento e asfaltos, além de ser convertido em matérias-primas essenciais para a indústria petroquímica como etileno, propileno, butadieno, entre outros (ROBBINS; HSU, 2000).

A extração do petróleo de reservatórios resultantes do acúmulo por milhões de anos é um processo que consiste na perfuração da superfície terrestre ou do leito marinho com o objetivo de liberar as altas pressões em que se encontram tais reservatórios, permitindo o fluxo de óleo cru através dos tubos para a superfície (WALTERS, 2020), de onde será transportado para as refinarias. Ao longo desse processo, a segurança deve ser elevada para minimizar que qualquer minúscula parte do óleo seja liberada no meio ambiente. Contudo, quando acidentes acontecem, dado o elevado volume envolvido em transporte, os danos ambientais podem ser catastróficos (ROBBINS; HSU, 2000) e comumente acompanhados de custos econômicos importantes (JORDAN; PAYNE, 1980).

1.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Entre os componentes do petróleo encontram-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), compostos por dois ou mais anéis aromáticos fundidos em um sistema de duplas ligações conjugadas ao longo dos seus anéis benzênicos (WICK et al., 2011).

Os HAPs são um grupo de poluentes orgânicos semivoláteis que estão amplamente distribuídos no meio ambiente, entrando nas matrizes ambientais de forma natural por meio de incêndios florestais e de pastagens, vazamentos de óleo, erupções vulcânicas e exsudatos de árvores (HARITASH; KAUSHIK, 2009) de formas antropogênica geralmente pela queima de combustível fóssil, veículos automotores, incineradores de resíduos, refino de petróleo, produção de coque e asfalto e produção de alumínio, combustão incompleta de materiais orgânicos, entre outros (ALEGBELEYE; OPEOLU; JACKSON, 2017; SROGI, 2007). O aumento das concentrações destes compostos detectados em ecossistemas terrestres e aquáticos, assim como no ar e em alimentos, representam uma séria ameaça à saúde dos seres humanos devido às características carcinogênicas e mutagênicas que apresentam esses contaminantes (ALEGBELEYE; OPEOLU; JACKSON, 2017; SROGI, 2007).

A persistência dos HAPs nos ecossistemas é amplamente conhecida. Esses compostos apresentam baixa solubilidade em água e uma forte adsorção sob a matriz do solo (CERNIGLIA, 1993; JOHNSEN; WICK; HARMS, 2005; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2014), o que limita a sua degradação e potencializa sua bioacumulação (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

1.2 Biorremediação

As técnicas convencionais para a remoção de HAPs de meios contaminados incluem tratamentos físicos e químicos como incineração, descoloração catalisada por base, oxidação UV, fixação, extração por solvente, entre outros. As técnicas convencionais, além das desvantagens de custo, e complexidade, não destroem completamente o contaminante (GAN; LAU; NG, 2009).

Nas últimas décadas o interesse na identificação de organismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo vem aumentando, tornando-se um eixo central na microbiologia do petróleo (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). O tratamento biológico via a biorremediação de matrizes contaminadas com HAPs oferece vantagens potenciais, como a completa decomposição do poluente, menor custo de tratamento, maior segurança e menor perturbação do solo (PENG et al., 2008). O processo resulta na redução da concentração dos contaminantes (WICK et al., 2011) e formação de compostos não perigosos, tais como dióxido de carbono e água (GHOSAL et al., 2016) em um processo chamado de mineralização (WICK et al., 2011), que depende de vários fatores como pH, temperatura, oxigênio, população microbiana, disponibilidade de nutrientes, estrutura química do composto, entre outras condições (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

A degradação microbiana pode ser mediada por diferentes microrganismos como algas, bactérias e fungos (CERNIGLIA, 1993; HARITASH; KAUSHIK, 2009). Devido à sua rápida adaptabilidade, ao longo da evolução, as bactérias desenvolveram estratégias para obter energia de praticamente todos os compostos, sendo consideradas atualmente os “limpadores” mais eficientes na natureza (GHOSAL et al., 2016). Diversos estudos identificaram espécies de bactérias capazes de degradar HAPs, sendo que nas últimas décadas as rotas de degradação do naftaleno e fenantreno têm sido as mais amplamente estudadas, com diferentes informações genéticas classificadas em inúmeras cepas nos gêneros *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Artobacter*, *Shingomonas*, *Ochrobacterum*,

Rhodococcus, *Acinetobacter*, *Mycobacterim*, *Polaromonas* e *Bacillus* (DENG et al., 2014; GHOSAL et al., 2016; SEO; KEUM; LI, 2009).

A biorremediação envolve uma série de limitações, como a mobilidade limitada das células dentro do solo, a resistência de microrganismos inoculados em competição com a população nativa, condições ambientais extremas resultantes de choque químico, pH e temperatura, predadores e altas concentrações de poluentes que podem causar danos irreversíveis ou inativar metabolicamente as células microbianas. O uso de enzimas pode reduzir ou eliminar a maioria desses fatores adversos (AHUJA; FERREIRA; MOREIRA, 2004).

As enzimas historicamente mais estudadas na biorremediação são as monooxigenases, dioxigenases, redutases e desalogenases bacterianas, além do citocromo P450 e moxoxigenases fúngicas. Esses estudos permitiram o desenvolvimento e aplicação de “coquetéis” enzimáticos tornando a biorremediação enzimática uma alternativa atraente. Além, das vantagens ambientais da biorremediação, o uso de enzimas resulta em ferramentas que podem ser digeridas *in situ* por microrganismos nativos. Por sua vez, a recomposição das enzimas no ambiente contaminado pode ser feita a um custo menor, visto que enzimas podem ser atualmente produzidas em larga escala e com maior atividade usando tecnologias de DNA recombinante (ALCALDE et al., 2006).

1.3 Monooxigenases flavodependentes

A oxifuncionalização envolve a introdução seletiva de átomos de oxigênio em posições contendo ligações C-H, C-O e C=C pela ação de enzimas oxigenases (mono- e dioxigenases, peroxigenases e halogenases). Essas enzimas utilizam espécies de oxigênio eletrofílicas ativadas, tais como as C4a-peroxiflavinas nas monooxigenases flavodependentes (FPMOs) e espécies hemo-oxiferril e composto Q no caso das monooxigenases dependentes e não-dependentes de heme, respectivamente (Figura 1) (DONG et al., 2018).

As FPMOs desempenham papéis importantes em vários processos biológicos desde a degradação da lignina até biossíntese de produtos naturais e a desintoxicação de compostos xenobióticos (PAUL et al., 2021; PAUL; GUARNERI; BERKEL, 2021). Além disso, enzimas desse grupo catalisam uma ampla gama de reações que incluem desde a epoxidação, desalogenação e desulfoxidação oxidativa até oxigenação de heteroátomos e oxidação de Baeyer-Villiger, sendo sua alta seletividade atraente para aplicação como biocatalisadores regioseletivos e enantiosseletivos na síntese de produtos químicos de alto valor agregado (DONG et al., 2018; HUIJBERS et al., 2014).

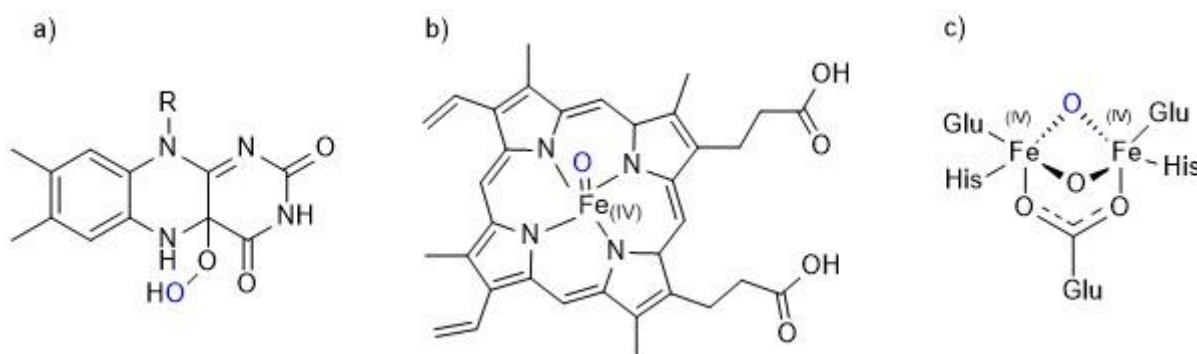


Figura 1 Espécies de oxigênio eletrofílicas ativadas mais comuns em monooxigenases: a) C4a-peroxiflavinas, b) espécies hemo-oxiferrila heme, c) composto Q. Em destaque os átomos de oxigênio eletrofílico. Fonte: O autor.

O mecanismo de incorporação de um átomo de oxigênio molecular no substrato nas monooxigenases dependentes de flavina (FPMO) depende do NADP(H), que tem a função de reduzir o cofator de flavina ligado à enzima (Figura 2a). Após a reação do FAD reduzido com oxigênio molecular, também conhecida como ativação do O₂, forma-se a espécie C4a-hidroperóxiflavina que, a depender do seu estado de protonação, atua como nucleófilo ou eletrófilo (Figura 2b) (HUIJBERS et al., 2014). Outra forma menos comum de ativação do oxigênio molecular envolve a formação de um aduto peroxila via o átomo N5 da flavina (Figura 2c) (PAUL et al., 2021).

Ainda, a partir da ativação do oxigênio pelo grupo isoaloxazina, se tem a via improdutiva, que ocorre quando não há qualquer reação com o substrato, resultando na degradação da C4a-hidroperoxiflavina em peróxido de hidrogênio e a flavina oxidada (Figura 2d). De modo a evitar tal caminho, as enzimas evoluíram para bloquear o acesso do solvente ao grupo isoaloxazina, diminuindo a formação do peróxido indesejado e garantindo que a reação majoritária no sistema biológico seja a de interesse (PALFEY; MCDONALD, 2010). Isso é particularmente importante para enzimas que requerem durante o ciclo catalítico, manter a espécie C4a-hidroperoxiflavina íntegra até que um substrato competente seja encontrado. Isto contrasta com a situação mais comum em que o reconhecimento do substrato sinaliza a redução da flavina, possibilitando que o substrato esteja a postos no sítio ativo tão logo a espécie C4a-hidroperoxiflavina seja formada (PALFEY; MCDONALD, 2010).

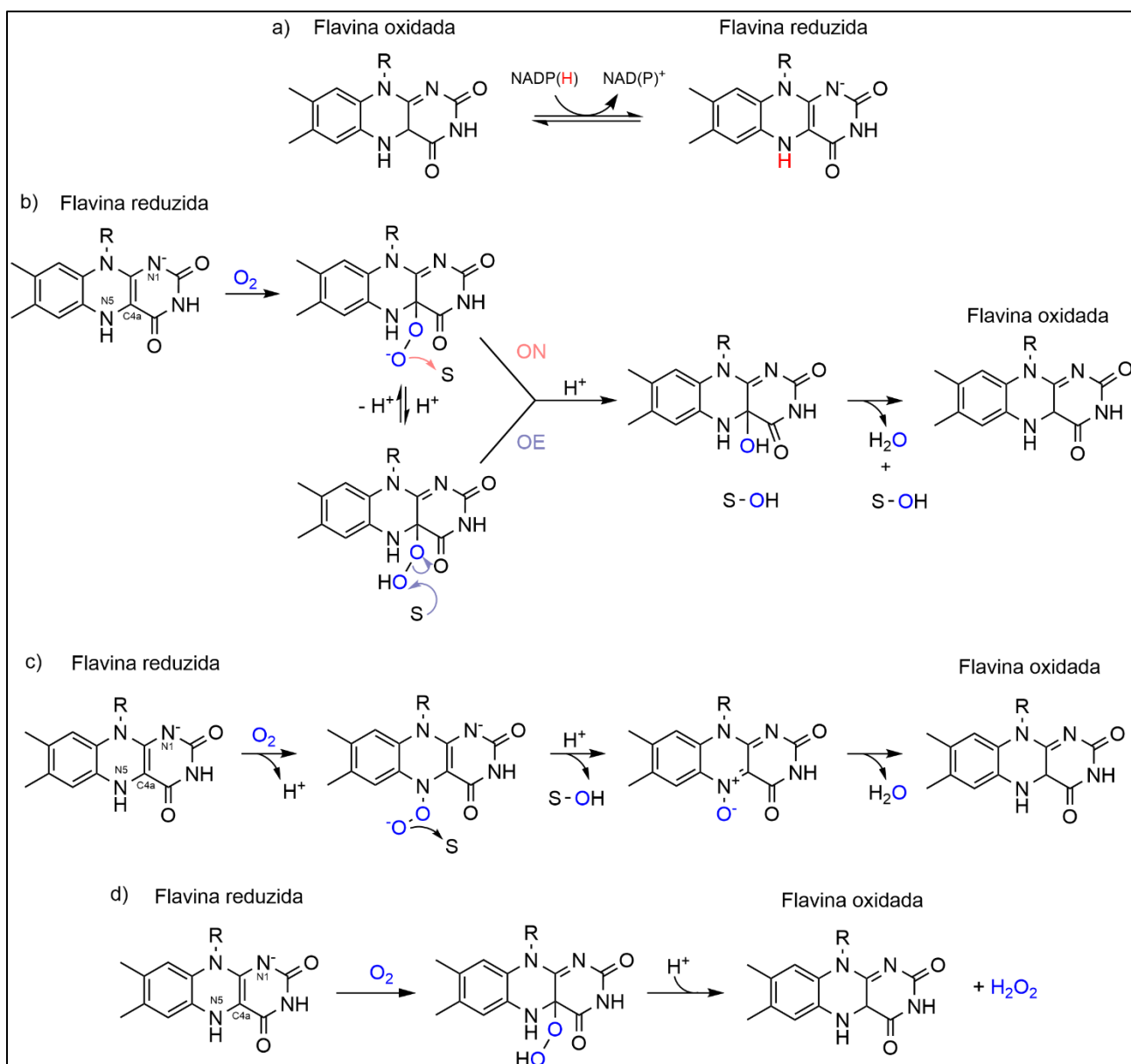


Figura 2 Reações envolvidas na ativação do oxigênio em monooxigenases dependentes de flavina: a) Redução da espécie oxidada da flavina pela ação do NAD(P)H, para formar a espécie reduzida de flavina, b) Reação entre a flavina reduzida e O₂ para formar C4a-hidroperoxiflavina, que pode reagir com substrato (S) via oxigenação nucleofílica (ON) ou oxigenação eletrofílica (OE) para formar o produto (SOH); c) Reação entre a flavina reduzida e O₂ para formar o N5-peróxido de flavina, que reage nucleofílicamente com substrato; d) Reação improdutiva, decomposição da espécie C4a-hidroperoxiflavina para render peróxido de hidrogênio e a flavina oxidada. Fonte: O autor.

1.3.1 Classificação das monooxigenases dependentes de flavina (FPMO)

As monooxigenases dependentes de flavina são classificadas com base em características estruturais, motivos de sequência proteica, espécie doadora de elétrons e tipo de reação catalisada (Tabela 1 e Figura 3). A classificação mais abrangente publicada em 2014 divide as FPMO em oito grupos (HUIJBERS et al., 2014).

As enzimas dos grupos A e B que utilizam NAD(P)H como doador externo de elétrons são mono-componentes, isto é, a redução da flavina e a reação com o substrato ocorrem no mesmo sítio. Enzimas desses grupos constituem mais da metade das FPMO conhecidas atualmente. Elas contêm domínios semelhantes do tipo sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas para a ligação do cofator FAD, mas diferem no modo de reconhecimento do NAD(P)H e no mecanismo de catálise. (PAUL; GUARNERI; BERKEL, 2021). Nos grupos C a F encontram-se as monooxigenases de dois componentes, que detêm a função redutase em um sítio diferente daquele onde ocorre a reação com o substrato. Por fim, tem-se as flavoproteínas dos grupos G e H, monooxigenases internas, que não precisam de um doador externo de elétrons e reduzem o cofator de flavina através da oxidação do substrato (PAUL et al., 2021).

Tabela 1 Classificação das monooxigenases dependentes de flavina (FPMO)

Classe	Grupo	Doador de elétrons	Cofator	Domínio de ligação da flavina	Ordem proposta de etapas reacionais ^a
Monocomponentes	A	NAD(P)H	FAD	sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas	1, 2, 3/ 4
	B	NAD(P)H	FAD	sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas	2, 3, 1, 4
Dicomponentes	C	FMNH ₂	FMN	TIM-barrel	5, 3, 1, 4
	D	FADH ₂ /FMNH ₂	FAD/FMN	acil-CoA dehidrogenase	1, 5, 3/ 1/ 4
	E	FADH ₂	FAD	sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas	5, 3, 1, 4
	F	FADH ₂	FAD	sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas	5, 3, 4, 1
Monocomponentes	G	Substrato	FAD	sanduíche $\beta\beta\alpha$ de três camadas	-
	H	Substrato	FMN	TIM-barrel	-

^a 1 ligação do substrato, 2 redução da flavina, 3 ativação do O₂, 4 monooxigenação do substrato, 5 redução da flavina pela redutase. As reações separadas por vírgula ocorrem de forma separada, as reações separadas por uma barra oblíqua ocorrem na mesma etapa reacional (CROZIER-REABE; MORAN, 2012). Fonte: O autor

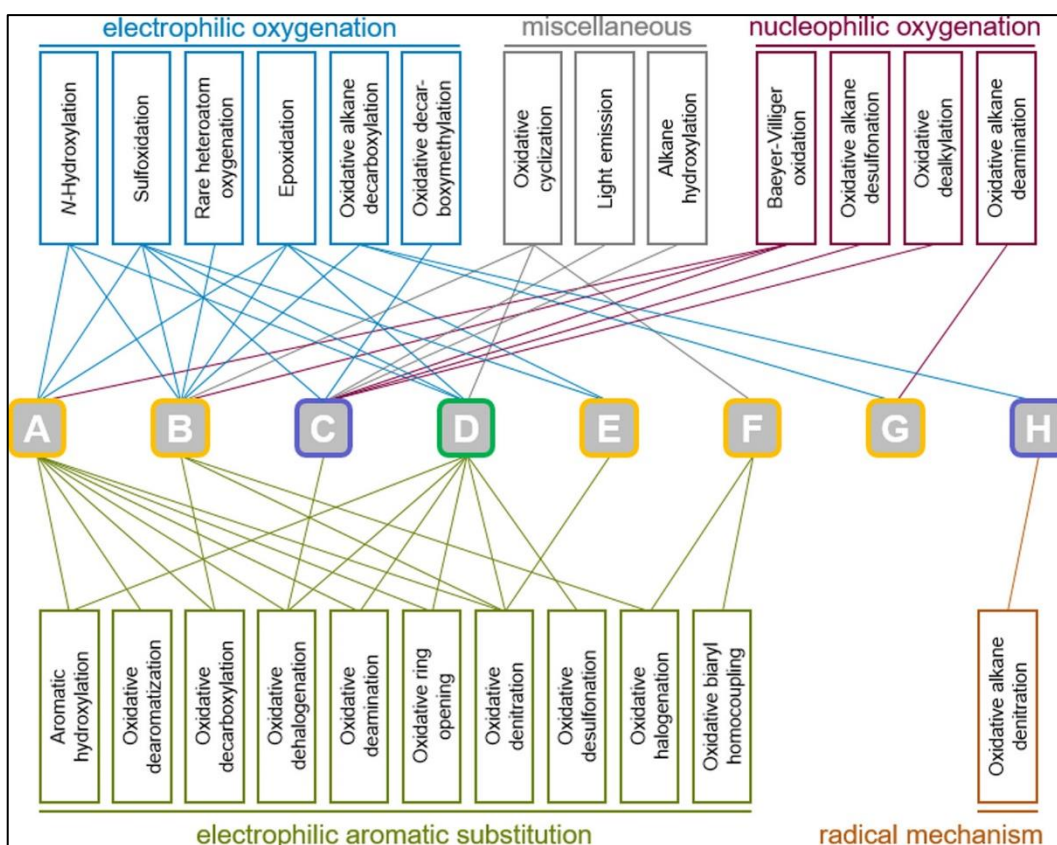


Figura 3 Representação esquemática das reações catalisadas por FPMOs. Fonte:(PAUL et al., 2021)

O foco deste trabalho é o estudo da salicilato hidroxilase de *Pseudomonas putida* (NahG), uma monooxigenase dependente de flavina do grupo A, que a exemplo de outros membros desse grupo está envolvida na degradação microbiana de compostos aromáticos policíclicos tais como o naftaleno (PAUL; GUARNERI; BERKEL, 2021). Enzimas desse grupo catalisam a *orto*- ou *para*-hidroxilação regioseletiva de compostos fenólicos, normalmente, via substituição eletrofílicas aromática (PAUL et al., 2021).

Entre suas particularidades estão a existência de um motivo específico de aspartato-glicina (DG), com função dupla na ligação do FAD e do NAD(P)H, além de, características distintivas na formação do complexo enzima-substrato, que estimula a taxa de redução do FAD pelo NAD(P)H e a liberação de NAD(P)⁺ em até 10 vezes em relação à ausência do substrato (HUIJBERS et al., 2014).

1.3.2 Degradação de naftaleno por *Pseudomonas putida* G7

O naftaleno é o hidrocarboneto policíclico (HAP) mais simples e mais solúvel em água e tem sido comumente usado como um composto modelo para investigar a capacidade de diferentes bactérias em degradar HAPs (SEO; KEUM; LI, 2009).

A genética do metabolismo de HAPs é conhecida em grande parte pelo estudo de plasmídeos relacionados ao catabolismo do naftaleno. Exemplo disso é o plasmídeo NAH7 de *Pseudomonas putida* G7 (GHOSAL et al., 2016). Os genes do catabolismo do naftaleno (*nah*) do NAH7 estão organizados em dois óperons. O primeiro codifica as enzimas envolvidas na conversão do naftaleno em salicilato, também chamada de via superior. O segundo óperon codifica as enzimas da via inferior envolvidas no catabolismo do salicilato em piruvato e acetaldeído. Ambos óperons são regulados por um gene comum *nahR*, que codifica uma proteína que age como regulador positivo (PENG et al., 2008) induzido por salicilato (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). A sequência completa e os genes que integram este plasmídeo NAH7 apresenta 82.232 bp (pares de bases, do inglês *base pairs*) e está disponível no banco de dados de nucleotídeos do “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” (número de acesso: AB237655) (SOTA et al., 2006).

Como observado na Figura 4, a primeira etapa no catabolismo do naftaleno (I) envolve a inserção de oxigênio molecular no núcleo aromático via o complexo enzimático da naftaleno dioxigenase, (NahAaAbAcAd) formando o *cis*-naftaleno dihidrodiol (II) (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). Subsequentemente, este composto é desidrogenado a 1,2-dihidroxi-naftaleno (III) pela *cis*-naftaleno dihidrodiol desidrogenase (NahB). A enzima 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (NahC) catalisa a formação do ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico (IV), que será convertido no ácido *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato (V) pela enzima 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato isomerase (NahD). O ácido *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato é convertido em salicilaldeído (VI) via a enzima hidroxibenzilidenopiruvato hidratase aldolase (NahE) e a via superior de degradação do naftaleno finaliza com a salicilaldeído desidrogenase (NahF), que produz o ácido salicílico (VII) a partir do salicilaldeído. Na via inferior, o salicilato é metabolizado para catecol (VIII) pela enzima salicilato

hidroxilase (NahG) e uma série de reações catalisadas pelas enzimas NahH, NahI, NahJ, NahK, NahL, NahM resultam em metabólitos para o ciclo do ácido cítrico (MALLICK; CHAKRABORTY; DUTTA, 2011; PENG et al., 2008; SEO; KEUM; LI, 2009).

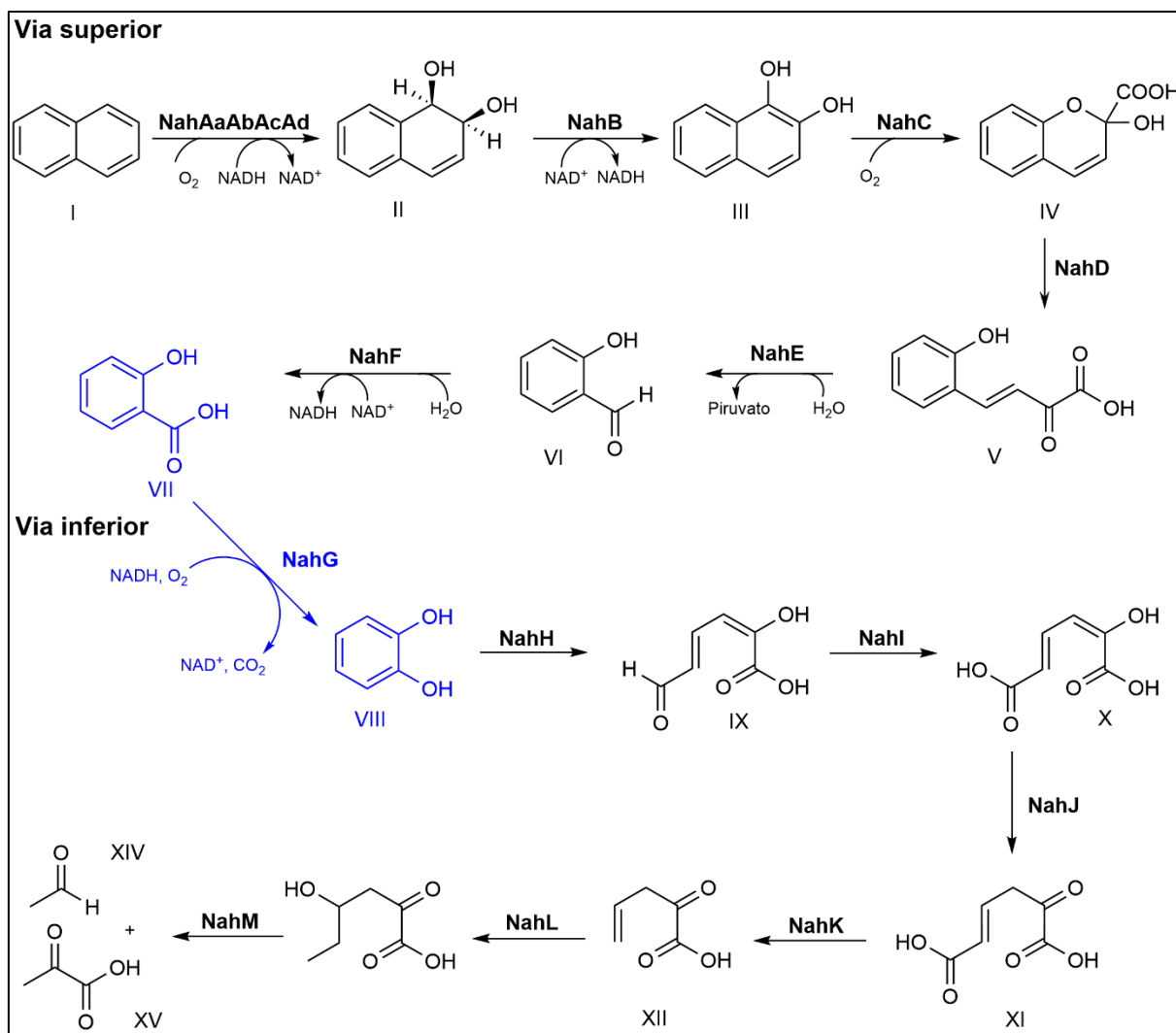


Figura 4 Degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida* G7. Em destaque a reação catalisada pela NahG, enzima estudada neste trabalho. Fonte: O autor

1.3.3 Salicilato hidroxilase

A salicilato hidroxilase de *Pseudomonas putida* G7 (NahG, EC 1.14.13.1) possui 450 resíduos de aminoácidos (COSTA et al., 2019) e uma massa molar de 48.964. É uma monooxigenase dependente de flavina do grupo A que catalisa a conversão de salicilato em catecol, CO₂ e água, via descarboxilação oxidativa, com consumo estequiométrico de oxigênio molecular (O₂) e NADH (Figura 3) (COSTA et al., 2019; KATAGIRI et al., 1962), conectando as vias superior e inferior no catabolismo do naftaleno (PENG et al., 2008; SEO; KEUM; LI, 2009).

O mecanismo proposto para a NahG envolve Substituição Eletrofílica Aromática (S_EAr), com a flavina servindo de espécie doadora de oxigênio eletrofílico. A inserção do oxigênio no anel aromático do salicilato, substrato da reação, resulta em um intermediário do tipo Wheland, que sofre descarboxilação para render o produto catecol (Figura 5) (COSTA et al., 2019; PEREIRA et al., 2022).

Como observado para as enzimas da classe A, a NahG apresenta dois domínios estruturais, o domínio I ou domínio de ligação do FAD e um domínio II N-terminal menor que forma a borda do sítio de ligação do substrato (CROZIER-REABE; MORAN, 2012).

A sobreposição da estrutura cristalográfica da NahG com outras enzimas da mesma família permitiu concluir que o sítio de ligação do substrato está claramente dividido em regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (COSTA et al., 2019). Os resíduos aromáticos (F85, W87, F230, F243 e W293) em uma folha β antiparalela juntamente com os resíduos não polares (A190, M194, M219, L221, L228 e V241) opostos ao anel de isoaloxazina do FAD formam um ambiente hidrofóbico voltado para o salicilato, compondo o sítio de ligação do substrato. Já a região hidrofílica é composta pelos resíduos carregados (D224, H226, R247, H322 e R383) próximos ao sítio ativo, localizado lateralmente à face-*re* do anel de isoaloxazina, e são responsáveis por tornar a superfície da proteína acessível ao solvente (COSTA et al., 2019).

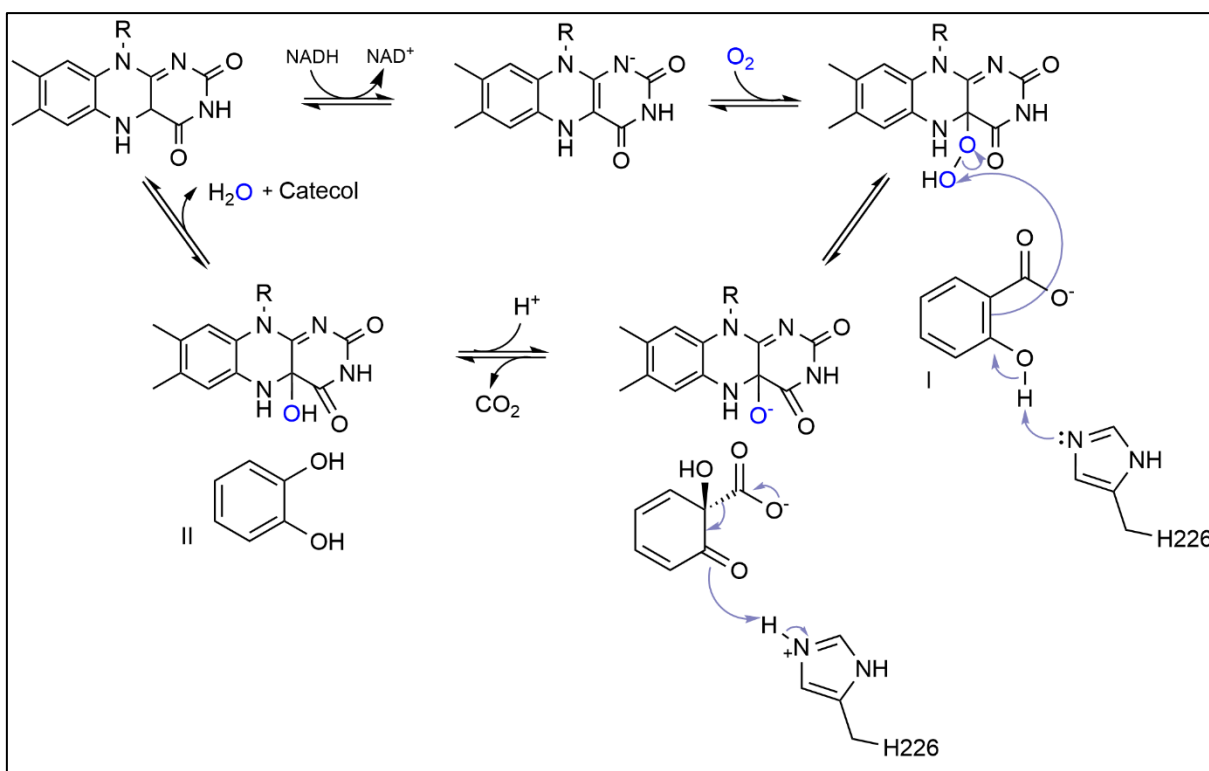


Figura 5 Etapas reacionais e mecanismo de descarboxilação oxidativa do salicilato (I) em catecol (II) via S_EAr catalisada pela salicilato hidroxilase (NahG), utilizando FAD como cofator. Fonte: O autor

A comparação estrutural da NahG com outras enzimas da família permitiu elucidar diversas informações sobre a arquitetura do sítio de ligação do FAD e a dinâmica do grupo isoaloxazina ao longo do ciclo catalítico (COSTA et al., 2019). O domínio de ligação do cofator FAD nas enzimas do grupo A, apresenta um arranjo sanduíche de três camadas do tipo $\beta\beta\alpha$ (CROZIER-REABE; MORAN, 2012). Outras regiões características da ligação do FAD incluem a sequência de impressão digital N-terminal (GXGXXG) G14-X-G16-XX-G19, que formam o enovelamento comum $\beta\alpha\beta$ conhecido por interagir com a porção ADP do FAD no domínio de ligação do cofator. Há também um motivo de sequência altamente conservado (D162-G163) que está envolvido na ligação das porções pirofosfato tanto do FAD quando do NADH. Por último, tem-se um motivo de sequência GD (G313-D314) em que o resíduo D314 conservado forma ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila O3' da cadeia ribitila, enquanto G313 interage com o grupo fosforila do FAD (COSTA et al., 2019).

Outros autores avaliaram o efeito de mutações sítio-dirigidas nos valores de K_d e nos parâmetros cinéticos k_{cat} e k_{cat}/K_m para determinar a influência de diferentes resíduos sobre a estabilidade do complexo enzima, flavina e substrato (E.Flavina.S) para enzimas da mesma família da NahG, evidenciando o papel do resíduo Y105 na estabilidade do substrato no sítio catalítico e do resíduo e H213 na oxidação do NADH para a formação do intermediário C4a-hidroperoxiflavina, para a enzima 3HB6H (MONTESINO et al., 2013)

Como observado na Figura 6, grupo isoaloxazina do FAD pode alternar entre duas conformações: externa e interna (COSTA et al., 2019). Na posição externa ocorre a ligação do substrato e a redução do FAD pelo NADH, enquanto na posição interna, o FAD reduzido reage com oxigênio molecular para formar a espécie FAD-hidroperóxido envolvida na reação com o substrato.

Resíduos conservados de aminoácidos participam da ligação do FAD, levando no seu ancoramento ao sítio de ligação e participando da dinâmica do grupo isoaloxazina (COSTA et al., 2019). Como observado na Figura 6a o resíduo E38 liga-se de forma bidentada com ambos os grupos hidroxila do grupo ribolisa. O resíduo D314 faz ligações de hidrogênio com o átomo O3' do grupo ribitila. Esses resíduos participam principalmente do ancoramento do FAD e não apresentam mudanças conformacionais aparentes durante a catalise. Contudo, a cadeia lateral de R111 oscila entre duas posições diferentes e desempenha um papel importante na dinâmica do grupo isoaloxazina. Na posição "interna", este resíduo faz ligações de hidrogênio com o átomo O2' (e possivelmente com o átomo O4') do grupo ribitila, enquanto na posição "externa" interage com o grupo fosforila da adenosina espacialmente próxima ao átomo O2' do grupo ribitila (MANENDA et al., 2020; PEREIRA et al., 2022).

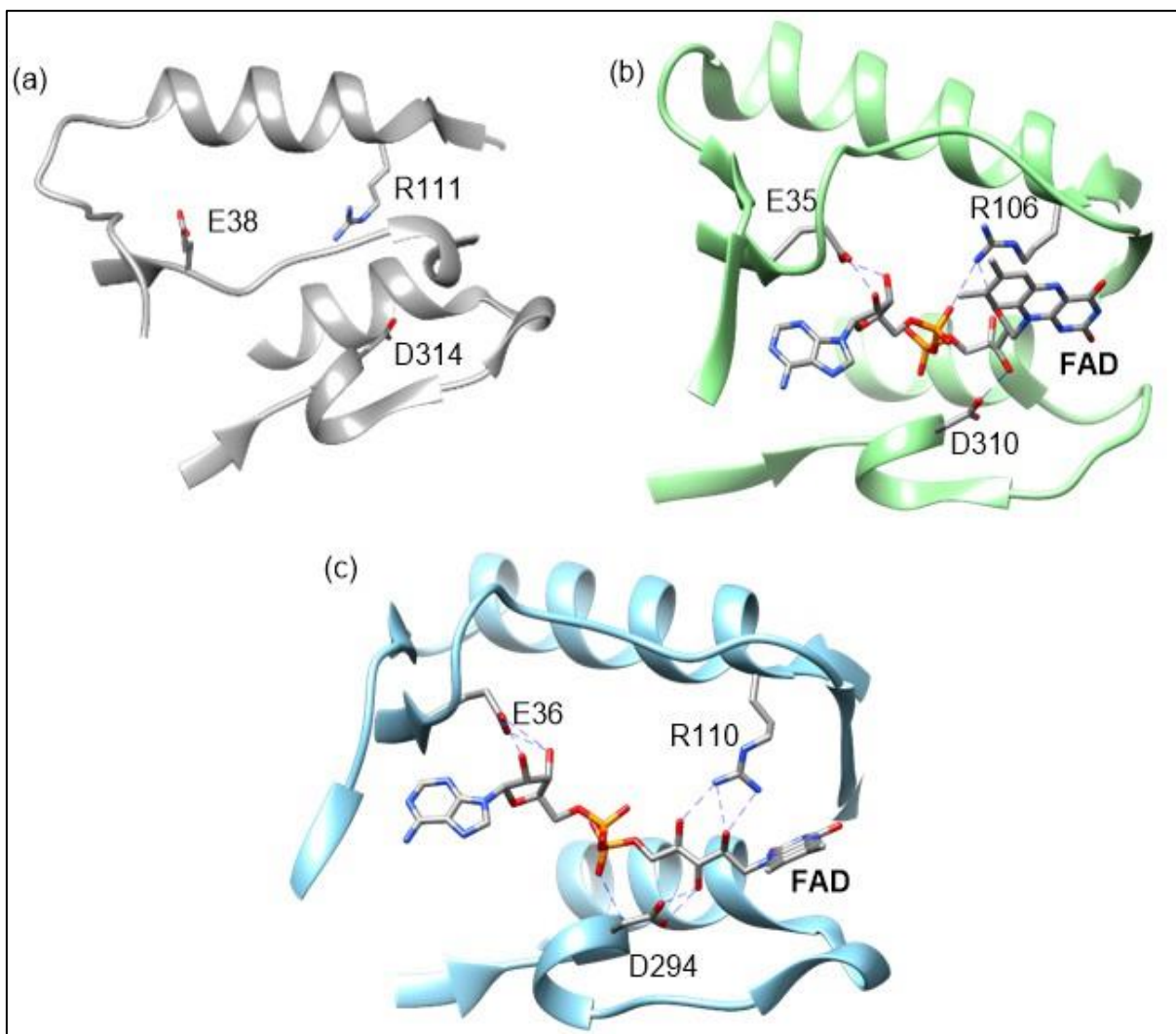


Figura 6 Fenda de ligação do FAD em diferentes conformações em flavoproteínas homologas: (a) Estado *apo* da 6xHis-NahG (PDB 6BZ5), em que a alça E38 a G53 encontra-se em uma conformação fechada; a alça equivalente encontra-se em uma conformação aberta após a ligação do FAD: grupo ribitil isoaloxazina na posição externa (b) e interna (c) em PhzS de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3C96) e 3HB6H de *Rhodococcus jostii* (PDB 4BJZ), respectivamente. Fonte: O autor.

Com o propósito de avaliar as interações envolvidas na ligação da flavina no sítio de ligação, as constantes de dissociação (K_d) para a formação do complexo FMN-NahG foram determinadas. Este complexo representa uma forma truncada do complexo FAD-NahG, onde o grupo adenosila monofosfato (AMP) foi extirpado (Figura 7). Os valores de K_d foram convertidos nas respectivas energias livres de ligação, possibilitando determinar que o grupo AMP do FAD contribui com pelo menos 3 kcal mol⁻¹ da ligação do FAD na NahG ($\Delta G^\circ = 10,2$ kcal mol⁻¹ a 25 °C), que apresenta

uma ligação mais fraca do que observada para um complexo FMN+AMP ($\Sigma\Delta G^\circ = 14,4$ kcal mol⁻¹ a 25 °C) (PEREIRA et al., 2022).

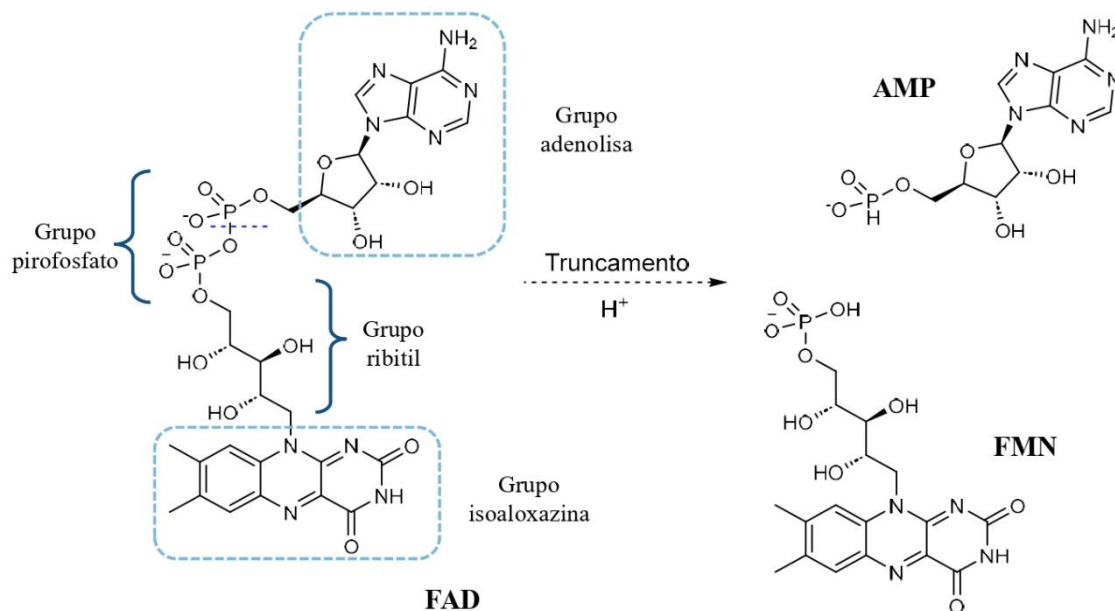


Figura 7 Truncamento do FAD em FMN mediante a remoção do grupo adenosila monofosfato (AMP)

1.4 JUSTIFICATIVA

Os estudos propostos neste trabalho visam entender o papel de resíduos polares altamente conservados (E38, R111 e D314) na ligação da Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) no sítio de ligação da salicilato hidroxilase (NahG), sendo relevantes para aprimorar nossa compreensão da função global dessa enzima e outras na mesma família. A escolha dos resíduos a serem mutados parte de estudos cristalográficos, que mostram que os resíduos E38 e D314 estão envolvidos em ligações de hidrogênio com os grupos ribosila e ribitila do FAD, respectivamente, constituindo uma importante fonte de interação do cofator no sítio de ligação, enquanto R111, que também, participa em interações por ligações de hidrogênio, tem uma atividade central na dinâmica do grupo isoaloxazina do FAD entre as posições externa e interna (Figura 6) (COSTA et al., 2019). A análise dessa dinâmica é crucial para entender não apenas quais fatores estão envolvidos na ligação do FAD, mas também como os rearranjos conformacionais influenciam a atividade oxidase da NahG no que concerne ao particionamento da espécie flavo-hidroperóxido entre as vias acoplada e desacoplada.

As mutações dos resíduos E38 e D314 foram realizadas para alanina (A) visando obter as variantes E38A e D314A, onde as interações por ligação de hidrogênio entre os resíduos mutados e o FAD é perdida, propiciando, assim, explorar a influência desses resíduos nas constantes de dissociação do complexo FAD-NahG. Por sua vez, o resíduo R111 foi mutado para glutamina (Q) para render a variante R111Q. Esta mutação é mais isoestérica do que a realizada para alanina visando, assim, causar menor impacto a estrutura da proteína.

A importância desses resíduos na estabilidade do complexo FAD-NahG e, por extensão, para a atividade oxidase da enzima, permite que o conhecimento gerado por este estudo preencha, não só lacunas na compreensão da bioquímica molecular da NahG e enzimas da mesma família, como também abre caminho para aplicações práticas, como o desenvolvimento de estratégias de engenharia enzimática e a otimização de biocatalisadores para fins industriais e biotecnológicos.

1.4.1 Objetivo geral

Compreender os efeitos termodinâmicos e cinéticos das mutações sítio-dirigidas E38A, D314A e R111Q, em relação à capacidade de ligação do FAD pela NahG e a catálise da descarboxilação oxidativa do salicilato.

1.4.2 Objetivos específicos

a) Determinar as constantes de dissociação (K_d) e as energias livres de ligação (ΔG°) correspondentes envolvidas na formação dos complexos FAD-NahG para as mutantes E38A, D314A e R111Q e comparar o efeito das mutações com os dados da enzima nativa.

b) Determinar o efeito das mutações sobre os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} para o salicilato, o NADH e o FAD e comparar o efeito das mutações com os dados da enzima nativa visando, assim, compreender o papel dos resíduos E38, D314 e R111 para a catálise da descarboxilação oxidativa do salicilato.

c) Determinar como os resíduos E38, D314 e R111 da NahG afetam o particionamento da espécie flavohidroperóxido entre as vias acoplada e desacoplada e comparar o efeito das mutações com os dados da enzima nativa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS MUTANTES SIMPLES DE NahG E38A, D314A E R111Q

Os plasmídeos contendo os genes 6xHis-NahG E38A, D314A e R111Q foram preparados na Tese de Doutorado em bioquímica e imunologia da discente Débora Abrantes Costa (ICB/UFMG) sob orientação do Prof. Ronaldo A. P. Nagem e expressos em bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) (COSTA et al., 2019).

2.1.1 Expressão dos mutantes E38A, D314A e R111Q da NahG

Inicialmente, preparou-se um inóculo das bactérias, seguindo protocolo previamente estabelecido no grupo (COSTA et al., 2019). Uma alíquota das bactérias congeladas em meio LB líquido (Luria -Bertani: 1% triptofano, 1% NaCl, 0.5% extrato de levedura e pH 7,0) contendo 25% de glicerol (pré-inóculo) foi adicionada à 20 mL de meio LB líquido contendo canamicina 0,1 mg mL⁻¹. O inóculo foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Terminado o período de incubação diluiu-se o inóculo na proporção de 1 parte de inóculo para 50 partes de meio líquido LB contendo canamicina 0,1 mg mL⁻¹. As células foram deixadas crescer sob condições de agitação de 200 rpm a 37°C e o crescimento foi monitorado por espectrofotometria até alcançar aproximadamente 0,7 unidades de absorbância em 600 nm. Alcançada essa leitura, incubou-se o meio por mais 20 min a 18°C e 200 rpm de agitação. Em seguida, adicionou-se IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) para 0,5 mM de concentração final para induzir a expressão da NahG. A indução foi feita por 16 h sob 200 rpm de agitação a 18°C. Por fim, o meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm por 40 min (Centrífuga Hereus Megafuge 40R Thermo Fisher com rotor de ângulo variável TX-750) para render aproximadamente 3g de bactéria por litro de meio de cultura. A porção sólida foi utilizada imediatamente na purificação das proteínas.

2.1.2 Purificação dos mutantes E38A, D314A e R111Q da NahG por cromatografia de afinidade e exclusão molecular

As células obtidas na etapa de expressão foram ressuspensas em tampão de lise (Tris 50 mM, sacarose 1 % (m/v), triton-x100 1 % (v/v), glicerol 1 % (v/v) em pH 7,4) em proporção de 30 mL de tampão de lise por litro de meio de cultura centrifugado. As células foram lisadas utilizando um ultrasonicador e o homogenato celular resultante foi centrifugado a 12000 rpm por 40 min a 4°C (Centrífuga Hereus Megafuge 40R Thermo Fisher com rotor de ângulo fixo Fiberlite F15-6x100y). O sobrenadante foi reservado para posterior injeção na coluna de afinidade.

Para a purificação da proteína 6HisxNahG, utilizou-se uma coluna de afinidade HisTrap™ HP de 5mL (GE Healthcare), seguindo uma modificação de protocolo previamente estabelecido (COSTA et al., 2019). A coluna foi pré-equilibrada com tampão A (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM, pH 7,4) e o sobrenadante obtido da lise celular foi injetado na coluna, que foi eluída com tampão A suficiente para que a absorbância em 280 nm atingisse um patamar próximo a zero. As proteínas foram eluídas da coluna utilizando um fluxo linear de 2 mL min⁻¹ de tampão B (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM pH, 7,4)

As frações contendo a 6HisxNahG coletadas na cromatografia de afinidade, foram reunidas e concentradas (tubo concentrador de 10000 MWCO) até um volume de 5mL e injetadas numa coluna de dessalinização HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare), que foi eluída com tampão C (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4). As frações contendo a proteína foram novamente concentradas para um volume de 1 mL e diluídas com glicerol 80 % suficiente para obter uma solução 25 % em glicerol, que foi dividida em alíquotas de 150 µL e estocadas em freezer -20°C para uso posterior.

2.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO DO COFATOR NA NahG POR FLUORIMETRIA

Os experimentos foram realizados em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, acoplado a um microcomputador contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados cinéticos Cary Eclipse 1.1(132). Os parâmetros do equipamento foram um tempo de integração de 0,1 s e uma tensão da fotomultiplicadora de 600 V. A metodologia aplicada foi conforme descrita previamente (COSTA et al., 2019).

Para as análises foram empregadas soluções 1,0 μM NahG (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM e NaCl 200 mM, pH 8,5) que foram tituladas com alíquotas de 10 μL de FAD (0 – 70) μM sob agitação magnética e termostatização para 25 °C. Entre cada adição de titulante, as amostras foram incubadas por 5 min antes de cada leitura. Utilizou-se cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 mL e quatro faces polidas. Os dados espectrofluorimétricos foram corrigidos para as diluições, que foram sempre inferiores a 5% do volume inicial ($V_0 = 3 \text{ mL}$). As fluorescências foram corrigidas considerando, $F = F_{\text{read}}(V_0 + V_t) / V_0$, onde F e F_{read} são as fluorescências corrigidas e medidas e V_0 e V_t são os volumes iniciais e total das alíquotas adicionadas, respectivamente. A concentração de titulante ao longo da titulação também foi corrigida considerando, $C = V_t C_s / (V_0 + V_t)$, onde C_s e C são as concentrações na solução estoque do titulante e após a diluição por V_t . Os tamanhos das fendas de excitação e emissão foram de 10 e 5 nm, respectivamente, para todos os experimentos.

As intensidades de fluorescência foram normalizadas em função do máximo de fluorescência na ausência de ligante. A fluorescência normalizada dos mutantes D314A e E38A foi corrigida para o efeito de filtro conforme descrito na seção 3.1.1.

2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_m e k_{cat} DO SUBSTRATO E COFATORES DA NahG POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

As determinações cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio, acoplado a um computador contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados cinéticos Cary WinUV. O espectrofotômetro foi equipado com um sistema de termostatização para cubetas acoplado a um banho termostático da PolyScience com precisão $\pm 0,1$ °C. Cubetas de quartzo de 1,4 mL e caminho óptico (b) de 1 cm foram utilizadas em todos os experimentos cinéticos.

As reações catalisadas pela NahG foram acompanhadas pelo consumo de NADH em 375 nm ($\epsilon = 1979 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As velocidades iniciais ($v = \Delta[\text{NADH}]/\Delta\tau$) das reações foram calculadas com auxílio da equação (1). Nessa equação, a $\Delta A/\Delta t$ é o coeficiente angular da variação da absorbância ao longo do tempo para os primeiros 5% de consumo de NADH, b é o caminho ótico da cubeta e ϵ_{rxn} é o coeficiente de absorvidade molar de todos os cromóforos consumidos e formados na mistura reacional. Em 375 nm, o NADH é o único cromóforo que sofre variação de sua concentração em função do tempo (BRANDÃO et al., 2023).

$$v = \frac{\Delta A/\Delta t}{\epsilon_{rxn} b} \quad (1)$$

As reações, em um volume total de 1 mL, foram realizadas na presença de concentrações crescentes de salicilato (substrato) e cofatores (NADH e FAD) em tampão Tris 56 mM contendo NaCl suficiente para resultar numa força iônica de 0,2 M em pH 8,5. Contudo, no caso da mutante R111Q, que apresenta uma baixa atividade catalítica, não houve ajuste de força iônica para minimizar a inibição da reação por sais de haletos (WHITE-STEVENSON; KAMIN, 1972). Todos os reagentes, com exceção do NADH e do salicilato, foram incubados por 4 min a 25 °C, quando se adicionou o NADH e incubou-se adicionalmente por 1 min antes de iniciar a reação pela adição de salicilado usando um aparato “add-mixer”.

2.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO FORMADO NA REAÇÃO CATALISADA PELA NahG.

A determinação da quantidade de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme metodologia descrita previamente (COSTA et al., 2019; PEREIRA et al., 2022). A oxidação de 400 μM NADH sob condições aeróbicas a 25 °C foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis na presença de 0,3 μM NahG, 400 μM de salicilato e 20 μM FAD, mantendo a força iônica igual a 0,2 M (NaCl) a pH 8,5 (Tris 56 mM). Após a oxidação completa do NADH, misturou-se 1 mL da mistura reacional com 1 mL de uma solução contendo peroxidase (700 u/L), 20 mM de fenol e 5mM de 4-aminoantipirina em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2, contendo 0,02% (v/v) azida de sódio e BSA 0,5% (m/v) (armazenada à 4°C). Após a incubação dessa solução com H_2O_2 a 37 °C durante 10 minutos, mediu-se a absorbância em 505 nm (A_{sal}) da antipirilquinonimina formada da reação da aminoantipirina com fenol na presença de H_2O_2 catalisada pela peroxidase. A porcentagem de peróxido formado foi determinada pela relação $\% \text{H}_2\text{O}_2 = 100(A_{\text{sal}}/A_{\text{bez}})$, onde A_{bez} corresponde a absorbância em 505 nm para a reação utilizando benzoato, um pseudosubstrato que promove exclusivamente a formação de 100% de peróxido de hidrogênio sem qualquer hidroxilação do substrato.

Além do método acima, implementou-se um método cinético para determinação de H_2O_2 , acompanhando a diferença no consumo de NADH e salicilato na faixa de 300 - 310 nm e o consumo de NADH na faixa de 370 - 380 nm. Este método será descrito na seção 3.2.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos conduzidos nesta dissertação com as variantes da NahG (E38A, D341A e R111Q) se deram em três frentes representadas ao longo desta seção como se segue:

- i. Avaliação da capacidade de ligação do FAD: as constantes de ligação do FAD ($1/K_d$) foram determinadas utilizando fluorimetria, o que requereu o desenvolvimento e aplicação de métodos de correção de efeito de filtro para concentrações elevadas de FAD,
- ii. Estudos catalíticos: os experimentos cinéticos foram realizados por espectroscopia na região UV-Vis. Os parâmetros K_m e k_{cat} para o salicilato, NADH e para o FAD foram determinados a partir dos perfis de Michaelis-Menten correspondentes,
- iii. Formação de produtos: a proporção de peróxido de hidrogênio formada pela via improdutiva foi avaliada por um método colorimétrico bem como por um novo método cinético desenvolvido neste trabalho.

Os resultados aqui apresentados são inéditos; e relevantes para elucidar, em relação à enzima nativa, o papel de diferentes resíduos da NahG envolvidos na ligação do FAD, catálise da descarboxilação oxidativa do salicilato e formação de produtos.

3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO DE COFATORES DA NahG POR FLUORIMETRIA.

A fluorescência das proteínas se deve majoritariamente as transições eletrônicas dos sistemas aromáticos dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A excitação em 292 nm em proteínas resulta na emissão de fluorescência em 340 nm, devida, quase que exclusivamente, aos resíduos de triptofano, que apresentam uma luminosidade (o produto da absorvidade molar e rendimento quântico) muito superior a observada para resíduos de tirosina e fenilalanina, que fluorescem pouco sob as mesmas condições de excitação. As emissões dos resíduos de Trp são altamente sensíveis ao ambiente químico e são frequentemente utilizadas para avaliar a formação de complexos enzima-ligante (LAKOWICZ, 2006).

A determinação das constantes de ligação do FAD com a NahG nativa e mutantes E38A, D314A e R111Q foram conduzidos por espectrofluorimetria. A Figura 8 apresenta os dados de fluorescência na presença de concentrações crescentes de FAD com excitação em 292 nm para a NahG nativa e a mutante R111Q, apresentando uma forte diminuição da intensidade de fluorescência em 340 nm.

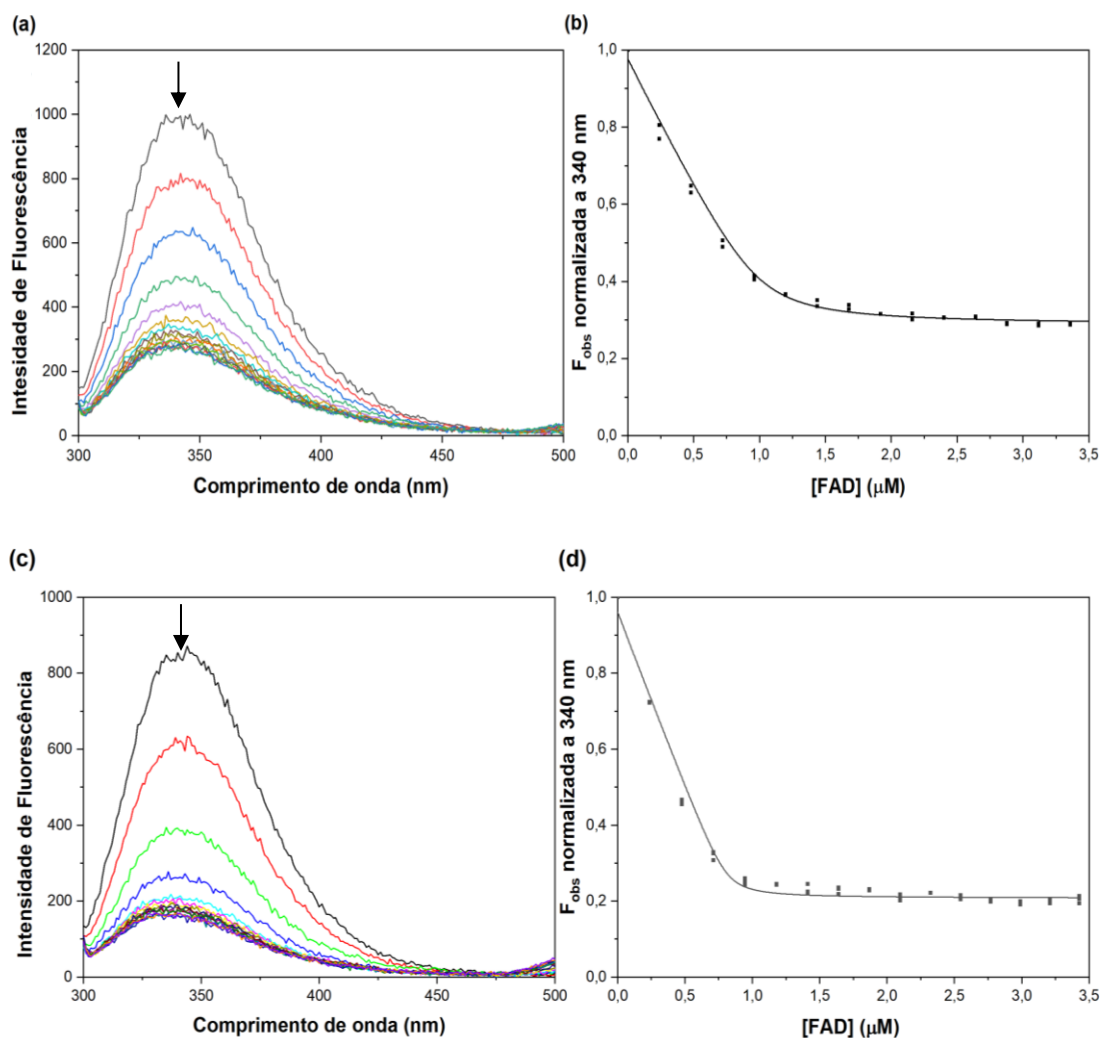


Figura 8 Titrões fluorométricas da NahG nativa (1 μM) e mutante R111Q (1 μM) com FAD (0 – 3,5 μM) em pH 8,5 (tampão HEPES 56 mM, 200 mM NaCl e 1,1 mM EDTA), força iônica (I) 0,2 a 25 $^{\circ}\text{C}$. Excitação em 292 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 10 e 5 nm respectivamente. Espectros de emissão da NahG nativa (a) e da mutante R111Q (c) na presença de concentrações crescentes de FAD. Fluorescência normalizada a 340 nm em função da concentração de FAD para NahG nativa (b) e mutante R111Q (d). As linhas sólidas são ajustes não-lineares usando a equação 2 e os valores de K_d apresentados na Tabela 2. Fonte: O autor

O processo de decaimento na intensidade de fluorescência (ou supressão, apagamento ou *quenching*) pode acontecer via *quenching* dinâmico ou colisional ou *quenching* estático. Os processos de supressão de fluorescência devidos à formação do complexo enzima-ligante obedecem ao fenômeno de *quenching* estático. Após ligação do FAD no sítio de ligação, os resíduos de Trp mais próximos do grupo isoaloxazina do FAD, aqueles coloridos de amarelo na Figura 9, sofrerão um maior

efeito do ligante por encontrar-se na denominada esfera de *quenching* efetivo (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012). O fenômeno de supressão é facilitado pela alta afinidade entre a flavoenzima e a flavina e envolve processos de transferência ressonante de energia (RET, do inglês *resonance energy transfer*) que são fortemente dependentes da distância entre o ligante e os resíduos de Trp (LAKOWICZ, 2006; YANG et al., 2003). O fenômeno de RET é compreendido, segundo a teoria de Förster, na transferência de energia não-radiativa de um doador (Trp) para um receptor (FAD) e depende das oscilações dos campos elétricos do estado excitado do doador e do estado fundamental do receptor (SOUZA; SIGOLI, 2012).

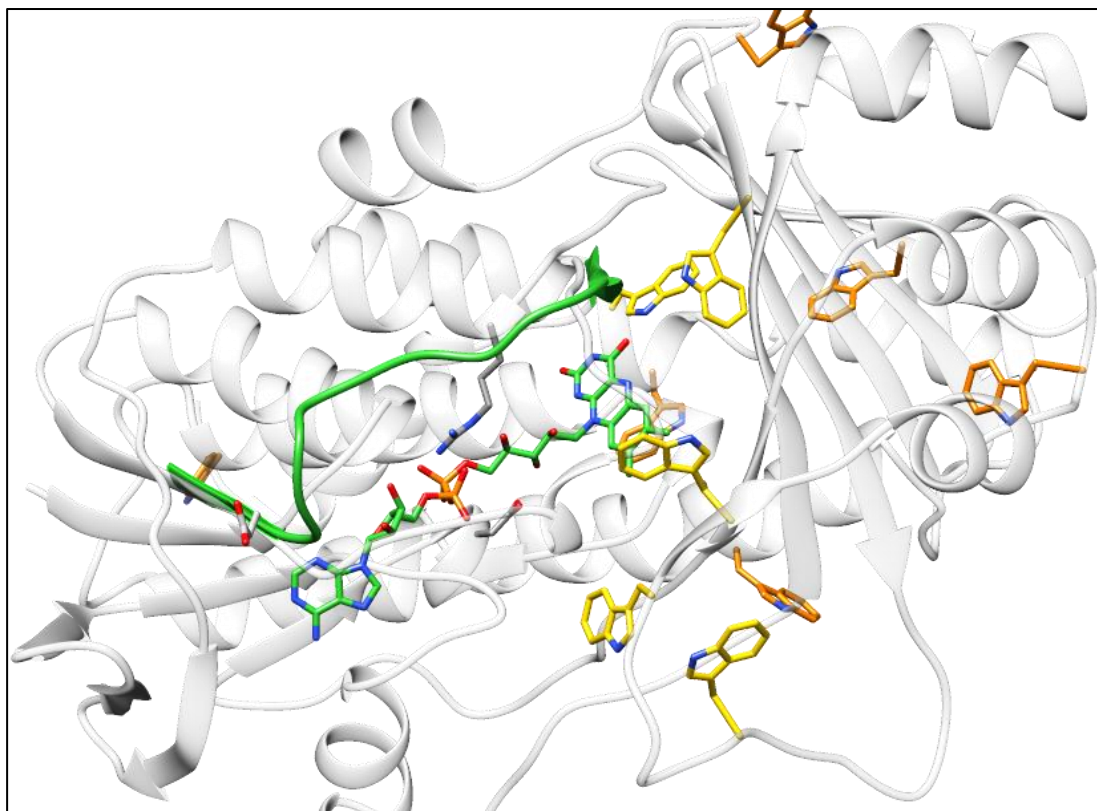


Figura 9 Posição de resíduos de triptofano na estrutura da *apo* NahG determinada por difração de raios-X (PDB 6BZ5). Em amarelo, estão mostrados os resíduos de Trp nas posições 84, 254, 260, 293 e 406 que estão próximos com o grupo isoaloxazina do FAD. Em laranja, estão mostrados os resíduos de Trp 80, 87, 276, 374, 404 e 423. O FAD e a alça em verde (resíduos 34-50) foram modelados a partir da estrutura de 3HB6H (PDB 4BJZ) ligada a FAD. Fonte: O autor.

A ligação do FAD na NahG produz um perfil de saturação consistente com a formação de um complexo NahG-FAD (Figura 8b, d). Analisando o espectro de

emissão da NahG nativa (Figura 8a) podemos observar um deslocamento no máximo de fluorescência de 350 para 330 nm ao longo da titulação. Este é um indicativo da presença de duas populações de triptofanos com diferentes ambientes químicos. A intensidade de fluorescência da primeira população é grandemente afetada pelo aumento da concentração de FAD por encontrar-se dentro da região da esfera de *quenching* efetivo (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012) onde os resíduos de triptofano próximos ao anel de isoaloxazina do FAD sofrerão *quenching* por transferência ressonante de energia (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019). Outras possíveis razões incluem mudanças conformacionais que afetam o ambiente químico dos resíduos de triptofano. A segunda população de triptofanos é a encarregada da fluorescência residual após a saturação da enzima com FAD. Essa população é representada pelos resíduos de triptofanos mais afastados do anel de isoaloxazina do FAD, que não sofrerão os fenômenos de *quenching* estático fortemente ligados à distância (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012; YANG et al., 2003).

O perfil hiperbólico da fluorescência observada (F_{obs}) versus a concentração de FAD é uma função da fluorescência das espécies livre (F_{free}) e ligada (F_{bound}) conforme a equação 2 e a fração molar da espécie ligada (χ_{bound}) de acordo com a equação 3 (BRANDÃO et al., 2023). O ajuste não-linear dos dados apresentados na Figura 8 (b, d) resulta na linha sólida e as constantes de dissociação (K_d) dos complexos formados (Tabela 2)

$$F_{obs} = F_{free} + (F_{bound} - F_{free})\chi_{bound} \quad (2)$$

$$\chi_{bound} = \frac{[E_{bound}]}{[E]_o} = \frac{([FAD]_o + [E]_o + K_d) - \sqrt{([FAD]_o + [E]_o + K_d)^2 - 4[FAD]_o[E]_o}}{2[E]_o} \quad (3)$$

A constante de dissociação do complexo FAD-NahG nativa de $0,034 \pm 0,007$ μM está de pleno acordo com o valor reportado por Pereira e colaboradores ($K_d = 0,036$ μM) sob as mesmas condições (PEREIRA et al., 2022). A mutação sítio-dirigida da R111Q resulta em um valor de constante de dissociação similar ($K_d = 0,032$ μM).

Enquanto a mutação R111Q resulta em uma modificação de natureza mais isostérica, com semelhanças importantes em relação às características físico-

químicas e eletrônicas entre os resíduos de arginina e glutamina, as mutações E38A e D314A correspondem a substituições mais drásticas, mas usualmente comuns por oferecerem uma forma eficiente de eliminar as funcionalidades da cadeia lateral após o carbono β . Isto ocorre sem introduzir excessiva flexibilidade na estrutura proteica, como poderia ocorrer com uma substituição por glicina.

A Figura 10 apresenta os dados das titulações fluorimétricas dos mutantes E38A e D314A com FAD, os quais após ajuste com as equações 2 e 3 resultaram nos valores de K_d de 8,9 e 4,7 μM , respectivamente. Em relação à enzima nativa ($K_d = 0,034 \mu\text{M}$), esses valores de K_d evidenciam a perda de afinidade entre a enzima e o ligante (FAD), nos mutantes, que requerem concentrações maiores de ligante para atender a saturação. Na prática, os valores de K_d para os mutantes E38A e D314A da NahG foram determinados somente após correção de efeito de filtro interno causado pela grande quantidade de FAD adicionado em solução. Esse tratamento será descrito em detalhes na seção 3.1.1.

A relação $\Delta G^\circ = -RT \ln(1/K_d)$ foi aplicada para converter os valores de K_d nas respectivas energias livres de Gibbs de ligação (ΔG°) a 25 °C que estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Constantes de dissociação (K_d), energias livres de ligação (ΔG°) e energias livres de desestabilização ($\Delta\Delta G$) dos complexos Enzima-FAD para NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A a 25 °C e pH 8,5, I = 0,2 M (NaCl). Os erros são desvios padrão. Fonte: O autor.

NahG	K_d (μM)	ΔG° a 25 °C (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ (kcal mol ⁻¹)
Nativa	0,034 \pm 0,007	-10,2 \pm 0,09	-
R111Q	0,032 \pm 0,003	-10,2 \pm 0,09	-0
E38A	8,9 \pm 0,7	-6,9 \pm 0,07	3,3
D314A	4,7 \pm 0,6	-7,3 \pm 0,1	2,9

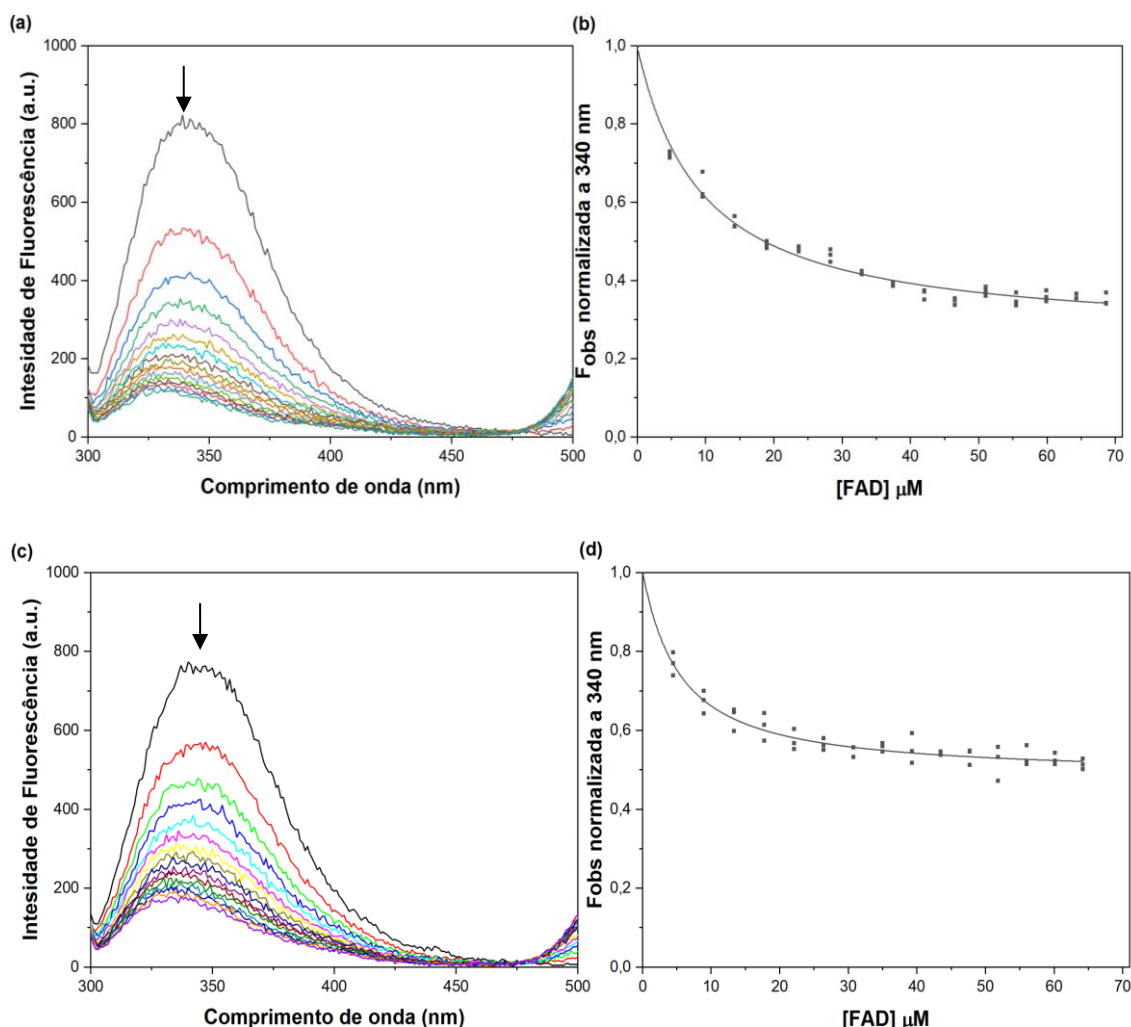


Figura 10 Titulações fluorométricas das variantes E38A (1 μM) e D314A (1 μM) da NahG com FAD (0 – 70 μM) em pH 8,5 (tampão HEPES 56 mM, 200 mM NaCl e 1,1 mM EDTA), força iônica 0,2 e 25 $^{\circ}\text{C}$. Excitação em 292 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 10 e 5 nm, respectivamente. Espectros de emissão da mutante E38A (a) e a mutante D314A (c) na presença de concentrações crescentes de FAD. Fluorescência normalizada a 340 nm em função da concentração de FAD para a mutante E38A (b) e mutante D314A (d). As linhas sólidas são os ajustes usando a equação 2 e os valores de K_d apresentados na Tabela 2. Fonte: O autor

A diferença entre a energia de ligação da enzima nativa e dos mutantes ($\Delta\Delta G$), chamada de energia livre de desestabilização ($\Delta\Delta G = \Delta G^{\circ}_{\text{mutante}} - \Delta G^{\circ}_{\text{nativa}}$) permite quantificar do ponto de vista termodinâmico as contribuições das cadeias laterais mudadas para a energia total de ligação do FAD. A pequena diferença entre as constantes de dissociação da NahG nativa e mutante a R111Q resulta em valores de energia livre de ligação similares ($\Delta\Delta G \sim 0$). Valores de $\Delta\Delta G$ inferiores a 0,5 kcal mol $^{-1}$ representam contribuições insignificantes na ligação às proteínas (VAN VRANKEN;

WEISS, 2012), indicando que o resíduo de R111 não é relevante na formação do complexo FAD-NahG. Tal observação é muito interessante, porque a proximidade entre a cadeia lateral do R111 e o grupo fosforila de FAD (Figura 6b, c, página 34) deveria resultar em fortes interações eletrostáticas, que deveriam ser perdidas com a mutação causando, assim, um forte aumento em K_d . Portanto, a ausência de efeito da mutação R111Q é surpreendente, mas, por outro lado, compreensível, pois do ponto de vista da dinâmica do resíduo R111, que alterna em posição e interações com as mudanças conformacionais com grupo isoaloxazina, a fraca interação deve ser importante para mediar essas mudanças conformacionais cruciais para a catálise.

É interessante notar que a NahG R111Q é purificada com aproximadamente 21% de FAD, similar ao observado para a enzima nativa, ressaltando uma vez mais a pequena participação desse resíduo na ligação do FAD. Por outro lado, a proporção de FAD co-purificada com as mutantes E38A e D314A foram inferiores a 1% e em consonância com os fortes aumentos em K_d para esses mutantes.

Os valores de $\Delta\Delta G$ de 2,9 e 3,3 kcal mol⁻¹ para as mutantes D314A e E38A respectivamente, sugerem que estas mutações contribuem juntas em 6,2 kcal mol⁻¹ (aproximadamente 60%) da energia total de ligação do FAD na enzima nativa. Valores de $\Delta\Delta G > 1,4$ kcal mol⁻¹ indicam uma grande contribuição na energia total de ligação dos aminoácidos estudados (VAN VRANKEN; WEISS, 2012). Os resíduos E38A e D314A formam ligações de hidrogênio com os grupos ribosila e hidroxila do grupo ribitila do FAD, respectivamente, contribuindo de forma contundente no ancoramento do FAD no sítio de ligação.

O efeito da mutação E38A sobre o ΔG° para o FAD é comparável com efeito de 2,5 kcal mol⁻¹ causado pelo truncamento do FAD para render FMN (Figura 7, página 35) e está dentro dos limites da ΔG° de 6,7 kcal mol⁻¹ para a ligação do AMP no complexo NahG-FMN (PEREIRA et al., 2022), demonstrando que a ligação de hidrogênio entre E38 e os grupos hidroxila do grupo ribosila, que ocorre de forma bidentada, responde por grande parte do ancoramento do grupo AMP do FAD na enzima. Desde o ponto de vista estrutural o a energia envolvida na ligação do FMN na NahG deve ser semelhante a energia de ligação do FAD na variante E38A da NahG

devido a que em ambos os casos as interseções com a fração AMP do FAD foram perdidas.

3.1.1 Correção de efeito de filtro interno

Como visto acima, estudos de fluorescência oferecem uma ferramenta valiosa para a obtenção de informações estruturais de proteínas e de interação com ligantes, particularmente, porque há uma forte dependência da emissão dos resíduos de triptofano e seu ambiente químico. O estudo da fluorescência intrínseca desses resíduos permite avaliar características estruturais em proteínas sem requerer modificações na proteína ou elevadas concentrações. Contudo, a interpretação adequada dos espectros de emissão só é possível evitando ou corrigindo possíveis distorções do espectro causadas por efeitos de filtro (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019).

Por exemplo, o efeito de filtro interno de emissão resulta da distorção do espectro de emissão devido à presença de uma substância que absorve luz no comprimento de onda de excitação (292 nm). Como as enzimas (NahG nativa e mutantes) são tituladas com FAD e este absorve na região de excitação ($\epsilon_{FAD, 290\text{ nm}} = 8000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (BRANDÃO et al., 2023), quando as concentrações de FAD $> 30\text{ }\mu\text{M}$ ($Ab_{S_{FAD}} \geq 0.3$) é vital realizar a correção do espectro de emissão para descontar o efeito sobre a fluorescência observada devido à presença de altas concentrações de FAD no meio. Isso foi particularmente importante para os mutantes D314A e E38A, onde as titulações requereram concentrações elevadas de FAD para saturação. Uma forma simples de realizar tal correção é o uso de um agente fluorescente com propriedades espectrais similares a da proteína, mas que não interage com o titulante. Um candidato natural com tais características é o triptofano.

Assim, preparou-se uma solução de triptofano $13\text{ }\mu\text{M}$, capaz de render uma intensidade de fluorescência próxima à das mutantes D341A e E38A no início da titulação. A Figura 11a mostra a dependência linear causada pelo aumento da concentração de FAD (0 – 70 mM), que produz uma diminuição na intensidade de fluorescência do triptofano devido a absorção do próprio FAD no comprimento de onda

de excitação (292 nm). Os fatores de correção (CF) para cada concentração de ligante foram determinados seguindo a relação $CF = F_{Trp(x)} / F_{Trp(0)}$; onde $F_{Trp(0)}$ e $F_{Trp(x)}$ são as intensidades de fluorescência da solução na ausência e na presença de concentrações crescentes de FAD, respectivamente.

A Figura 11b ilustra, a título de exemplo, os dados não-corrigidos e corrigidos para o mutante E38A. As intensidades de fluorescência (corrigidas para a diluição) ao longo das titulações dos mutantes D314A e E38A (Figura S1 e Tabela S2) foram normalizadas dividindo a intensidade de fluorescência da enzima em 340 nm pelo fator de correção CF obtido com a solução de triptofano para cada concentração X de FAD de acordo com a relação: $F_{E,corr(x)} = F_{E(x)} / CF$ (Figura 11b, linha vermelha) (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019). A correção do efeito de filtro interno ao longo da titulação permite obter uma maior precisão nos valores de K_d (Figura 11b, linha vermelha) quando comparados com os dados não-corrigidos (Figura 11b, linha preta).

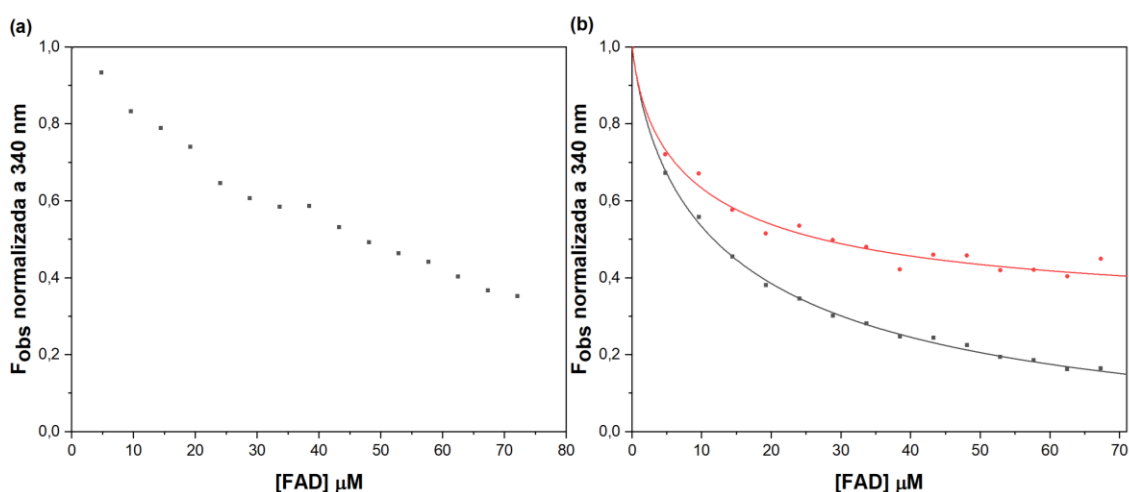


Figura 11 Correção do efeito de filtro interno nas titulações fluorométricas de uma solução de triptofano (13 μM) (a) e para a mutante E38A (1 μM) (b) com FAD (0 – 70 μM) em pH 8,5 (tampão HEPES 56 mM, 200 mM NaCl e 1,1 mM EDTA), $I = 0,2$ e 25 °C. Excitação em 292 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 10 e 5 nm, respectivamente. Fluorescência normalizada a 340 nm em função da concentração de FAD para a mutante E38A (b) as linhas vermelha e preta são, respectivamente, os ajustes usando a equação 2 dos dados corrigidos e não-corrigidos pelo efeito de filtro interno. Fonte: O autor.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_m e k_{cat} DO SUBSTRATO E COFADORES POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis

As atividades catalíticas dos mutantes R111Q, E38A e D314A da NahG foram avaliadas no pH ótimo de 8,5 a 25 °C, sob diferentes concentrações de salicilato e cofatores (FAD e NADH). A Figura 13 apresenta os gráficos das velocidades iniciais na presença de concentrações crescentes dos ligantes (L) FAD, salicilato e NADH. Os perfis mostram um comportamento de saturação para $v/[E]$, que foram ajustados utilizando a equação 4. Os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}^{ap}[L]}{K_m + [L]} \quad (4)$$

O valor de K_m é definido pela equação (4) como a concentração de cada espécie (L) necessária para atingir a metade da constante catalítica aparente ($k_{cat}^{ap}/2$). Portanto, se relaciona com a estabilidade dos complexos com os ligantes em equilíbrio com as suas formas não-ligadas e sob estado estacionário até a etapa que precede a primeira etapa irreversível na direção dos produtos (Figura 12) (VAN VRANKEN; WEISS, 2012). Os valores de K_m para a enzima nativa e mutantes (Tabela 3) foram convertidos nas energias-livres de Gibbs de formação utilizando a relação $\Delta G_{EL} = -RT \ln(1/K_m)$ a 25 °C.

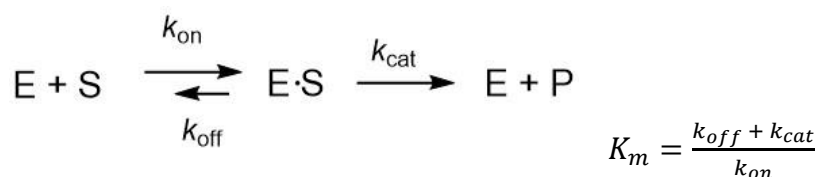


Figura 12 Caminho reacional comum em reações enzimáticas. O K_m relaciona-se com a estabilidade dos complexos com os ligantes em equilíbrio com as suas formas não-ligadas e sob estado estacionário até a etapa que precede a primeira etapa irreversível na direção dos produtos, enquanto k_{cat} relaciona-se a etapa catalítica onde as reações químicas ocorrem com o substrato. Fonte: O autor

Por sua vez, o $k_{\text{cat}}^{\text{ap}}$ é uma constante catalítica aparente, determinada em excesso de um dos ligantes (FAD, NADH e salicilato), e se relaciona com a constante catalítica real (k_{cat}) da forma completamente ligada a FAD, NADH e salicilato (Tabela 4). Nessa relação, o valor de k_{cat} pode ser estimado de acordo com a equação 5, considerando a fração molar da enzima ligada ao NADH ($\chi_{\text{E}\cdot\text{NADH}}$), salicilato ($\chi_{\text{E}\cdot\text{Sal}}$) e FAD ($\chi_{\text{E}\cdot\text{FAD}}$).

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{cat}}^{\text{ap}} / \chi_{\text{E}\cdot\text{FAD}} \chi_{\text{E}\cdot\text{NADH}} \chi_{\text{E}\cdot\text{sal}} \quad (5)$$

As energias livres de Gibbs para k_{cat} ($\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$) foram calculadas utilizando a relação de Eyring $\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln(kh/k_{\text{B}}T)$; onde, k corresponde a k_{cat} , enquanto h e k_{B} são as constantes de Planck e Boltzmann, respectivamente.

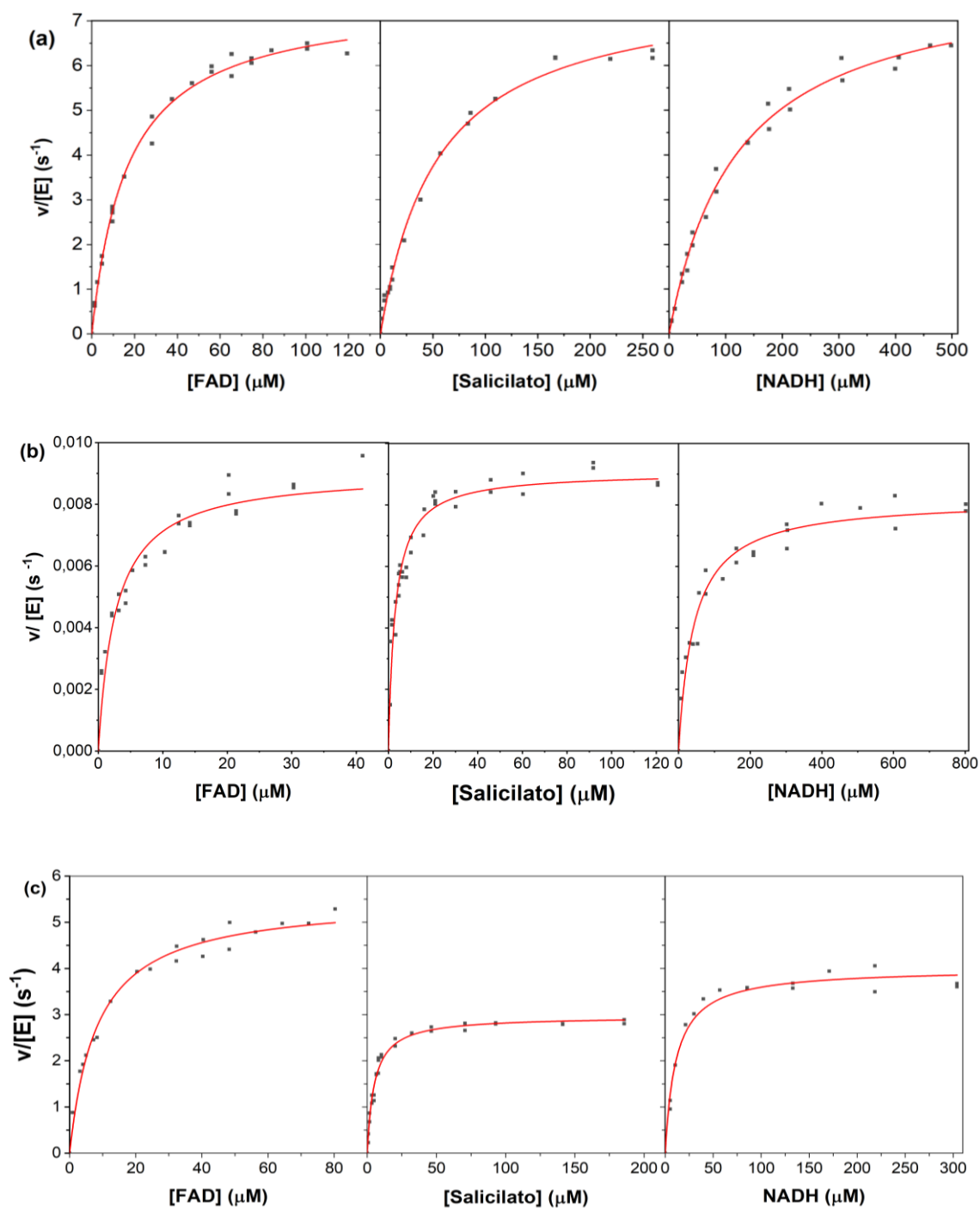


Figura 13 Perfis cinéticos das variantes (a) E38A, (b) R111Q e (c) D314A em função da concentração de FAD, salicilato e NADH na conversão de salicilato em catecol pH 8,5 (Tris 55,6 mM) e 25 °C. Os dados para (a) E38A e (c) D314A foram determinados sob força iônica ($I = 0,2$) mantida com 200 mM NaCl, enquanto os estudos para (b) R111Q foram realizados na ausência de NaCl e sob força iônica baixa. Os dados foram ajustados utilizando a equação (4), e os parâmetros cinéticos apresentados na tabela 3. Fonte: O autor

Tabela 3 Valores de K_m e energias-livres de Gibbs (ΔG_{EL}) para $1/K_m$ para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A a 25 °C e pH 8,5, I = 0,2 M (NaCl). Os erros são desvios padrão.

NahG	K_m (μM)			ΔG_{EL} a 25 °C (kcal mol^{-1}) ^c		
	FAD	NADH	Sal	FAD	NADH	Sal
Nativa^a	0,53 ± 0,05	27 ± 4	28 ± 3	-8,6 ± 0,1	-6,2 ± 0,2	-6,2 ± 0,2
R111Q^b	2,7 ± 0,4	43 ± 5	3,0 ± 0,3	-7,6 ± 0,1 (1,0)	-6,0 ± 0,2 (0,2)	-7,5 ± 0,2 (-1,3)
E38A	16,2 ± 0,8	120 ± 8	54 ± 4	-6,5 ± 0,1 (2,1)	-5,3 ± 0,1 (0,8)	-5,8 ± 0,1 (0,4)
D314A	8,4 ± 0,7	11,2 ± 1	5,1 ± 0,3	-6,9 ± 0,1 (1,7)	-6,8 ± 0,2 (-0,6)	-7,2 ± 0,1 (-1,0)

^a Valores de referência (PEREIRA et al., 2022).

^b Força iônica não-ajustada para 0,2 M com NaCl.

^c Em parêntesis são valores de $\Delta\Delta G_{EL}$ em relação à NahG nativa.

Os valores de k_{cat} foram obtidos a partir de cinéticas acompanhadas pelo desaparecimento do NADH e, portanto, referem a atividade oxidase da NahG. Como discutido anteriormente, o consumo do NADH é acompanhado pela redução do FAD a FADH⁻, que rapidamente reage com O₂ para formar uma espécie FAD-hidroperóxido central. Essa espécie pode reagir com o substrato na via acoplada ou decompor pela via desacoplada produzindo H₂O₂. Assim, k_{cat} é o resultado da somatória das constantes individuais de cada via, acoplada e desacoplada, definidas por k_{cp} e k_{ucp} , respectivamente, que podem ser determinadas pelas relações $k_{ucp} = k_{cat} \chi_{ucp}$ e $k_{cp} = k_{cat} (1 - \chi_{ucp})$. A χ_{ucp} refere a fração de espécies FAD-hidroperóxido que reagem pela via desacoplada e pode ser estimada pela quantidade de H₂O₂ formada a partir dessa espécie ou pela relação entre a atividade da conversão do substrato pela atividade oxidase do NADH.

A determinação da χ_{ucp} foi realizada por um método cinético que será detalhado na seção 3.2.1. Para fins de comparação, as quantidades de H₂O₂ também foram

determinadas por um método colorimétrico para a NahG nativa. Os valores de k_{cp} , k_{ucp} e $\%H_2O_2$ determinadas para a NahG nativa e variantes estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4 Constantes catalíticas para a atividade oxidase e energias-livres de Gibbs correspondentes para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A a 25 °C e pH 8,5, I = 0,2 M (NaCl). Os erros são desvios padrão.

NahG	k_{cat}^{ap} (s ⁻¹)	k_{cat}^c (s ⁻¹)	ΔG_{cat}^\ddagger a 25 °C (kcal mol ⁻¹) ^d
Nativa^a	9,6 ± 0,2	16,6 ± 0,3	15,8 ± 0,1
R111Q^b	0,0091 ± 0,0002	0,0104 ± 0,0004	20,2 ± 0,1 (4,4)
E38A	7,8 ± 0,2	13,3 ± 1	16,0 ± 0,1 (0,2)
D314A	2,96 ± 0,04	3,5 ± 0,1	16,7 ± 0,1 (0,9)

^a Valores de referência (PEREIRA et al., 2022);

^b Força iônica não-ajustada para 0,2 M com NaCl.

^c Valor estimado considerando $k_{cat} = k_{cat}^{ap} / \chi_{E \cdot FAD} \chi_{E \cdot NADH} \chi_{E \cdot sal}$.

^d Em parêntesis são valores de $\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger$ em relação à NahG nativa

Tabela 5 Quantidade de H₂O₂ (em %), constantes de velocidade das vias acopladas e desacopladas e energias-livres de Gibbs correspondentes a estas etapas para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa e variantes R111Q, E38A e D314A a 25 °C e pH 8,5, I = 0,2 M (NaCl). Os erros são desvios padrão; nd são valores não-determinados.

NahG	% H ₂ O ₂		k_{cp}^c (s ⁻¹)	ΔG_{cp}^\ddagger a 25 °C (kcal mol ⁻¹) ^d	k_{ucp}^c (s ⁻¹)	ΔG_{ucp}^\ddagger a 25 °C (kcal mol ⁻¹) ^d
	Colorim.	Cinético				
Nativa^a	15	14 ± 2	15,1	15,8 ± 0,1	1,5	17,2 ± 0,1
R111Q^b	n.d.	100 ± 3	Muito lenta	Muito alto	0,0104 ± 0,0004	20,2 ± 0,1 (2,9)
E38A	n.d.	33 ± 2	8,9 ± 0,7	16,2 ± 0,1 (0,3)	4,4 ± 0,3	16,6 ± 0,1 (-0,6)
D314A	n.d.	35 ± 2	2,3 ± 0,1	17,0 ± 0,1 (1,1)	1,2 ± 0,04	17,3 ± 0,1 (0,1)

^a Valores de referência (PEREIRA et al., 2022) % H₂O₂ = 10;

^b Força iônica não-ajustada para 0,2 M com NaCl.

^c Valor estimado a partir do valor de k_{cat} considerando a extensão da reação desacoplada $k_{ucp} = k_{cat}\chi_{ucp}$, $k_{cp} = k_{cat}(1-\chi_{ucp})$.

^d Em parêntesis são valores de $\Delta\Delta G_{cp}^\ddagger$ e $\Delta\Delta G_{ucp}^\ddagger$ em relação a NahG nativa.

As mutações E38A e D314A causam um aumento nos valores de K_m para o FAD de 30 e 15 vezes, respectivamente, quando comparados com a NahG nativa, sendo mais um indicativo da importância dos resíduos E38 e D314 na ligação do cofator. O efeito combinado na energia de livre de formação do estado ligado ($\Sigma\Delta\Delta G_{EL} = 3,8$ kcal mol⁻¹ a 25 °C) corresponde a 45% da energia total de formação do estado ligado na enzima nativa (Tabela 3). Esse valor é comparável com o efeito combinado dos mutantes E38A e D314A sobre a energia total de formação do complexo E.FAD de ($\Sigma\Delta\Delta G = 6,2$ kcal mol⁻¹) responsável pelo 60% da energia total de formação do complexo como determinado por fluorimetria. É interessante notar, que uma vez formado o complexo E.FAD, os eventos dinâmicos responsáveis pela redução do FAD

e a formação do intermediário C4a-hidroperoxiflavina passam a ser governados majoritariamente por outros resíduos, entre eles o resíduo R111.

O aumento do K_m para o NADH de 5 vezes para a mutante E38A em relação à NahG nativa demonstra a importância do resíduo E38 para a ligação tanto do FAD como do NADH. Esses dados corroboram os estudos estruturais realizados por Wang e colaboradores (2001), que compararam as estruturas das enzimas PHBH nativa e mutante R220Q obtidas por difração de raios-x. Os resultados sugerem que os resíduos (R33, Q34, Y38, R42 e R44), na região de interação com o grupo pirofosfato e parte do grupo adenosila do FAD, são importantes na interação com a porção adenosila do NADPH (MONTESINO et al., 2013; WANG et al., 2002). A sobreposição da NahG (PDB 6BZ5) com a PHBH (PDB 1IUW) revela que essa importante região compreende o resíduo E38 na NahG, que é estruturalmente homólogo ao resíduo E32 na PHBH.

Por outro lado, a mutação do resíduo D314, diretamente envolvido em interações com o FAD, resulta em um efeito pequeno sobre a ligação do NADH, indicando que sua participação na ligação do NADH é apenas marginal. O aumento de aproximadamente 2 vezes no valor de K_m para salicilato na reação catalisada pela mutante E38A é também indicativo da baixa importância desse resíduo para a estabilidade do complexo E.S.

O pequeno efeito da mutação E38A sobre k_{cat} indica que esta mutação afeta muito pouco a atividade oxidase da NahG (Tabela 4). Contudo, observou-se um incremento considerável na formação de peróxido de hidrogênio, com proporções de 90% catecol / 10% H_2O_2 e 67% catecol / 33% H_2O_2 para as enzimas nativa e mutante E38A (Tabela 5). O efeito da mutação reflete parcialmente o observado para a reação da enzima nativa utilizando FMN como flavina com uma proporção 43% catecol / 57% H_2O_2 (PEREIRA et al., 2022). De modo que, o efeito da mutação E38A é consistente com a desestabilização do intermediário C4a-hidroperoxiflavina causada por mudanças distais no sítio catalítico que resultam na perda de interações eletrostáticas e na capacidade de ligação do intermediário. Como consequência, com a difusão do

intermediário para a solução, a degradação mediada pelo solvente pode ocorrer resultando em um aumento da proporção de via desacoplada.

Em consonância com o observado acima, o efeito na desestabilização da via acoplada causada pela mutação E38A ($\Delta\Delta G_{cp}^\ddagger = 0,32 \text{ kcal mol}^{-1}$) é comparável com as $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ resultante da regeneração da via acoplada do FMN com a adição de AMP, que correspondem ao 50% do efeito causado pelo truncamento do FAD em FMN (PEREIRA et al., 2022). Indicando que o resíduo E38 é o responsável majoritário da estabilização do AMP na energia total de ativação do FAD.

A pequena diminuição em 2 e 4 vezes nos valores de K_m do NADH e salicilato, respectivamente, para a variante D314A sugere pouca participação desse resíduo na ligação desses ligantes (Tabela 3). Contudo, a diminuição de 5 vezes no valor de k_{cat} é consistente com o papel do resíduo D314 na dinâmica responsável pela redução do FAD com NADH, uma etapa que precede a formação do intermediário C4a-hidroperoxiflavina (Tabela 4). É interessante notar que a maior parte desse efeito se dá sobre a reação acoplada ($\Delta\Delta G_{cp}^\ddagger = 1,1 \text{ kcal mol}^{-1}$), com pouco ou nenhum efeito sobre a reação desacoplada em relação à NahG nativa (Tabela 5).

A proporção de 65% catecol / 35% H_2O_2 para a reação com a mutante D314A é comparável à observada com a mutante E38A (Tabela 5) e espelha a pequena diferença observada nos valores de K_d para esses dois mutantes (Tabela 2), sugerindo que uma ligação mais fraca da flavina resulta em proporções mais elevadas de H_2O_2 .

O efeito combinado dos resíduos E38 e D314 (Tabela 5) sobre a capacidade catalítica para a hidroxilação do substrato ($\Sigma\Delta\Delta G_{cp}^\ddagger = 1,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), corresponde a 56% do efeito causado pelo truncamento do FAD para render riboflavina ($2,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) (PEREIRA et al., 2022), demonstrando o papel crucial desses resíduos na estabilização do intermediário C4a-hidroperoxiflavina que conduz a formação do catecol. Porém, estas contribuições representam cerca dos 10% dos $15,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ da energia livre de Gibbs de ativação para o FAD na enzima nativa, o que sugere que a maior parte da capacidade catalítica da enzima reside no grupo isoaloxazina (PEREIRA et al., 2022).

A mutação R111Q resulta em efeitos de 5, 2 e 10 vezes no valor de K_m para FAD, NADH e salicilato, respectivamente (Tabela 3). O pequeno efeito para FAD de $1,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ é consistente com a inexistência de efeito dessa mutação sobre K_d (Tabela 2). Esses pequenos efeitos indicam que este resíduo tem pouca participação na estabilização do complexo entre a enzima e os ligantes. Contudo, a mutação R111Q produz uma drástica diminuição do k_{cat} em 1800 vezes e um forte desfavorecimento da via acoplada (0% catecol / 100% H_2O_2), um efeito quase tão drástico quanto o observado para as reações com riboflavina (3% catecol / 97% H_2O_2) (PEREIRA et al., 2022). Tais observações são consistentes com o papel do resíduo R111 na dinâmica do anel de isoaloxazina entre as conformações aberta e fechada. A mutação para glutamina resulta em uma perda das interações relacionadas a esta dinâmica, fazendo com que o equilíbrio entre as duas conformações esteja deslocado para a conformação aberta, onde a redução e a oxigenação do anel de isoaloxazina continuam a ocorrer (EPPINK; SCHREUDER; VAN BERKEL, 1998), mas a longa exposição ao solvente facilita a decomposição do intermediário C4a-hidroperoxiflavina para a forma oxidada do FAD e H_2O_2 sem qualquer hidroxilação do substrato.

É interessante notar que a desestabilização da via desacoplada em $2,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela 5) devido a mutação R111Q indica também que a conformação aberta afeta a redução da flavina pelo NADH ou, possivelmente, a oxigenação com O_2 da flavina reduzida, desfavorecendo a formação de peróxido de hidrogênio a despeito do fato de ser mais favorável do que a hidroxilação do substrato. Um aspecto que sugere que a oxigenação está sendo afetada é o fato dessa reação ser mais favorável na conformação fechada, a qual é menos acessível por conta da mutação R111Q.

3.2.1 Método cinético para a determinação de H₂O₂ na via improdutiva.

Ao longo das últimas décadas, diferentes métodos foram desenvolvidos para quantificar peróxido de hidrogênio e estimar a fração de reação desacoplada (χ_{ucp}). Dentre eles, o método de Trinder tem sido o mais utilizado. Neste método, a concentração de H₂O₂ é determinada uma vez que todo o NADH é consumido no meio reacional (BRANDÃO et al., 2023). Esse método tem a vantagem de ser barato e facilmente aplicável para determinação de peróxido de hidrogênio para a NahG nativa. Contudo, a perda de capacidade catalítica dos mutantes resulta em tempos de reação longos trazendo diversos problemas relacionados à estabilidade da enzima, substrato e/ou produtos. Assim, neste trabalho, buscou-se desenvolver um método simples e eficaz para determinar a quantidade de H₂O₂ sob condições de velocidade inicial em que a reação é acompanhada até o consumo dos primeiro 10% do NADH adicionado.

No método cinético, a reação é acompanhada por espectroscopia UV-Vis e a velocidade da reação é calculada com auxílio da equação 1 (Página 39). Na região entre 300 e 380 nm, onde ϵ_{rxn} considera as absorvidades molares do NADH e do salicilato consumidos na reação, um aumento na proporção de via desacoplada, resulta em uma velocidade que será sempre menor no comprimento de onda onde o substrato e o NADH absorvem quando comparada ao comprimento de onda onde somente o NADH absorve. Este é o caso quando a fração de reação desacoplada não é considerada para definir o ϵ_{rxn} , que deve ser calculado considerando a fração de reação acoplada (χ_{cp}) conforme a equação (6).

$$\epsilon_{rxn} = \chi_{cp} \epsilon_S + \epsilon_{NADH} \quad (6)$$

Substituindo (6) em (1), temos uma equação que descreve a velocidade de descarboxilação oxidativa do salicilato por NahG em função da fração de reação produtiva, equação (7); onde, o coeficiente angular (*slope*) corresponde a $\Delta A/\Delta t$ ou taxa de variação da absorbância ao longo do tempo.

$$slope = v(\chi_{cp} \epsilon_S + \epsilon_{NADH}) \quad (7)$$

Para ilustrar em detalhes o método cinético apresentado acima, na Figura 14 está a sobreposição dos espectros de UV-Vis do salicilato e do NADH (absortividade molar em função do comprimento de onda) mostrando duas regiões importantes: *i.* entre 300 e 310 nm, na qual a variação da absorbância ao longo do tempo (*slope*) será função do consumo tanto do NADH quanto do salicilato; *ii.* acima de 350 nm, onde o *slope* será função unicamente do consumo de NADH.

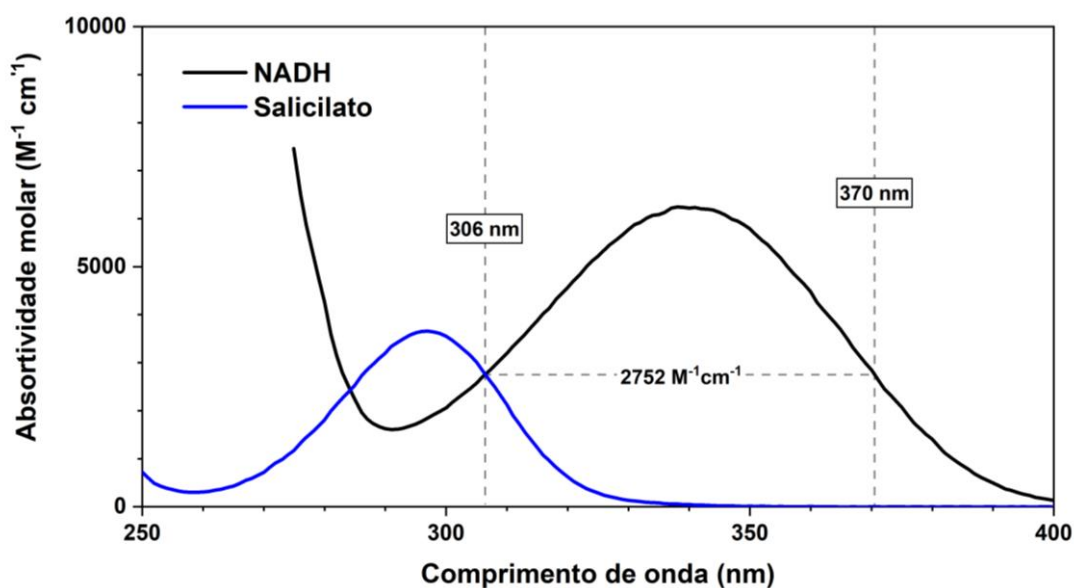


Figura 14 Espectros de UV-Vis dos cromóforos salicilato e NADH. Os espectros foram determinados em água a pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Fonte: O autor.

Os espectros das reações são monitorados em função do tempo na faixa de 300 e 380 nm até os primeiros 10% de NADH consumidos. A Figura 13 apresenta o resultado desse monitoramento em 306 e 370 nm para o consumo de salicilato e NADH catalisado pela NahG nativa. O *slope* em 370 nm de $1,99 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Figura 13b, linha preta) são menores do que o observado em 306 nm, $\text{slope}_{306} = 3,21 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Figura 13b, linha vermelha), por um fator de 1,6 vezes, inferior a 2 vezes, como esperado para uma reação completamente acoplada ($\chi_{cp} = 1$).

Como observado na Tabela 6, os *slopes* são calculados em múltiplos comprimentos de onda para ampliar a precisão do método. Em posse desses dados, o sistema de equações (8a, b) é resolvido; onde λ_1 e λ_2 correspondem aos

comprimentos de onda nas regiões entre 300 e 310 nm e entre 370 e 380 nm, respectivamente. Para um dado comprimento de onda λ_1 , a fração de reação produtiva ou acoplada é calculada para cada comprimento de onda λ_2 (Tabela 7).

$$slope_{\lambda_1} = v(\chi_{cp} \epsilon_{S_{\lambda_1}} + \epsilon_{NADH_{\lambda_1}}) \quad (8a)$$

$$slope_{\lambda_2} = v(\chi_{cp} \epsilon_{S_{\lambda_2}} + \epsilon_{NADH_{\lambda_2}}) \quad (8b)$$

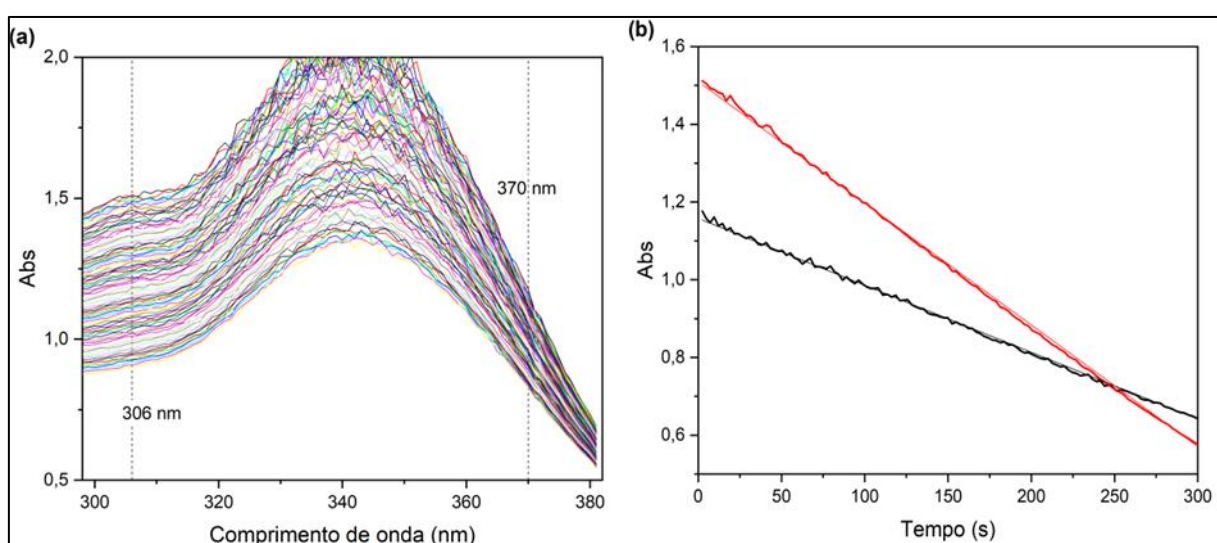


Figura 15 Determinação da proporção de via acoplada da NahG por um método cinético. Em (a) estão os espectros de UV-Vis em função do tempo na faixa de consumo do salicilato e do NADH. Em (b) estão os gráficos de absorvância em função do tempo nos comprimentos de onda de 306 nm (linha vermelha) e 370 nm (linha preta). As linhas sólidas são coeficientes angulares (*slopes*) obtidos por ajuste linear dos dados. A reação foi catalisada pela NahG nativa na presença de FAD (22 μM), NADH (300 μM) e salicilato (200 μM), pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Fonte: O autor.

Tabela 6 Coeficientes angulares (*slope*) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG nativa na presença de FAD (22 μM), NADH (300 μM) e salicilato (200 μM) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

λ_2 (nm)	$10^3 \text{ Slope (s}^{-1}\text{)}$		λ_1 (nm)	$10^3 \text{ Slope (s}^{-1}\text{)}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b		Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
380	0,871	0,908	310	3,056	2,933
379	0,935	0,967	309	3,130	2,989
378	1,027	0,962	308	3,073	2,954
377	1,086	1,137	307	3,038	3,034
376	1,146	1,206	306	3,208	2,954
375	1,212	1,274	305	3,231	3,226
374	1,380	1,385	304	3,204	3,235
373	1,521	1,507	303	3,251	3,13
372	1,680	1,602	302	3,186	3,031
371	1,630	1,795	301	3,136	2,978
370	1,992	1,935	300	3,190	2,953

^a [NahG] = 0,071 μM ; ^b [NahG] = 0,306 μM

Os dados utilizados para determinar a χ_{cp} nos mutantes da NahG E38A, D314A e R111Q estão apresentados nas Tabelas S18, S19 e S20, respectivamente.

Tabela 7 Fração de reação acoplada ou produtiva (χ_{cp}) para a reação catalisada pela NahG nativa na presença de FAD (22 μ M), NADH (300 μ M) e salicilato (200 μ M) a pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C.

		$\chi_{cp}(\lambda_1, \lambda_2)$										
λ_1 (nm) \ λ_2 (nm)		300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
380		0,93	0,89	0,92	0,95	0,93	0,95	0,94	0,85	0,88	0,94	0,91
379		0,91	0,87	0,90	0,93	0,91	0,93	0,92	0,83	0,86	0,92	0,88
378		0,90	0,86	0,88	0,91	0,89	0,91	0,90	0,81	0,84	0,89	0,85
377		0,91	0,87	0,89	0,92	0,90	0,92	0,91	0,82	0,85	0,91	0,87
376		0,96	0,93	0,95	0,99	0,96	0,99	0,98	0,89	0,93	0,99	0,96
375		1,00	0,96	0,99	1,03	1,00	1,03	1,03	0,94	0,98	1,05	1,02
374		0,90	0,86	0,88	0,92	0,89	0,91	0,90	0,81	0,84	0,90	0,86
373		0,84	0,80	0,82	0,85	0,82	0,84	0,83	0,73	0,76	0,80	0,76
372		0,77	0,73	0,74	0,77	0,74	0,75	0,74	0,64	0,66	0,69	0,64
371		0,92	0,89	0,91	0,94	0,92	0,94	0,94	0,85	0,88	0,93	0,90
370		0,73	0,69	0,70	0,72	0,69	0,70	0,68	0,59	0,60	0,63	0,58

Dos dados apresentados na Tabela 7 determinou-se uma χ_{cp} de $0,86 \pm 0,02$ para a reação de salicilato catalisada pela NahG nativa. A fração de reação desacoplada foi determinada pela equação (9).

$$\chi_{cp} + \chi_{ucp} = 1 \quad (9)$$

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- i.* De acordo com a determinação das constantes de dissociação (K_d) e energias-livres correspondentes de ligação do FAD na *apo* enzima, os complexos E.FAD são 2,9 e 3,3 kcal mol⁻¹ mais fracos para os mutantes E38A, e D314A em relação à enzima nativa. Estas mutações contribuem juntas em 6,2 kcal mol⁻¹ (cerca de 60%) da energia total de ligação do FAD na enzima nativa ($\Delta G = 10,2$ kcal mol⁻¹) e demonstram o importante papel destes resíduos na interação com o FAD. Esse valor é comparável com o efeito combinado dos mutantes E38A e D314A na energia-livre de formação do estado ligado ($\Sigma\Delta\Delta G_{EL} = 3,8$ kcal mol⁻¹ a 25 °C) determinada a partir dos valores de K_m para o FAD. Neste caso, o efeito combinado corresponde a 45% da energia total de formação do estado ligado na enzima nativa ($\Delta G_{EL} = 8,6$ kcal mol⁻¹).
- ii.* O pequeno efeito combinado das mutações E38A e D314A na energia-livre de Gibbs para o k_{cat} ($\Sigma\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger = 1,0$ kcal mol⁻¹ a 25 °C) em relação à atividade da NahG nativa ($\Delta G_{cat}^\ddagger = 15,8$ kcal mol⁻¹) sugere que a maior parte da capacidade catalítica reside no grupo isoaloxazina e outras porções da enzima. Contudo, as mutações resultam em uma menor estabilização do intermediário C4a-hidroperoxiflavina, levando à perda de interações eletrostáticas que afetam a capacidade de ligação do intermediário. Como consequência, a degradação do intermediário mediada pelo solvente resulta em um aumento de 3 vezes na proporção de via desacoplada em comparação com à enzima nativa.
- iii.* A mutação sítio-dirigida R111Q resulta em uma constante de dissociação ($K_d = 0,032$ μ M) semelhante à enzima nativa ($K_d = 0,034$ μ M), o que é surpreendente do ponto de vista das interações eletrostáticas que deveriam ocorrer entre o resíduo R111 e o FAD. Contudo, dado que as interações entre o resíduo R111 e o FAD estão envolvidas em eventos dinâmicos, a inexistência de interações fortes é compreensível pois permite que

o grupo FAD acesse duas conformações, aberta e fechada, com interações R111-FAD diferentes. Contudo, é interessante notar que a mutação R111Q provoca uma redução drástica do k_{cat} em 1800 vezes e um forte desfavorecimento da via acoplada (0% catecol / 100% H₂O₂), consistente com um papel importante do resíduo R111, possivelmente sobre a dinâmica do anel de isoaloxazina. A mutação para glutamina resulta em uma perda das interações relacionadas a esta dinâmica, fazendo com que o equilíbrio entre as duas conformações esteja deslocado para a conformação aberta, onde a redução e a oxigenação do anel de isoaloxazina continuam a ocorrer, mas a hidroxilação do substrato é desfavorecida.

iv. Neste trabalho, desenvolveu-se um método simples e eficaz para determinar a fração de reação desacoplada sob condições de velocidade inicial. Para NahG, o método se baseia no cálculo da velocidade da reação em múltiplos pontos na região entre 300 e 380 nm, no qual um aumento na proporção de via desacoplada, resulta em uma velocidade que será sempre menor no comprimento de onda onde o substrato e o NADH absorvem quando comparada ao comprimento de onda onde somente o NADH absorve. O método tem vantagem sobre os métodos atualmente utilizados, pois não requer a determinação de H₂O₂ e longos tempos de análise, permitindo que seja empregado para enzimas com baixa atividade.

Como observado acima, neste trabalho foi possível relacionar os efeitos termodinâmicos e cinéticos das mutações sítio-dirigidas E38A, D314A e R111Q em relação à capacidade de ligação do FAD pela NahG e a catálise da descarboxilação oxidativa do salicilato. Os dados são consistentes com o importante papel dos resíduos E38 e D314 no ancoramento do FAD no sítio de ligação, e o papel do resíduo R111 na estabilização do intermediário C4a-hidroperoxiflavina sem efeito significativo sobre a capacidade de ligação do FAD na enzima.

REFERÊNCIAS

AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 2–3, p. 125–154, 2004.

ALCALDE, M. et al. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281–287, jun. 2006.

ALEGBELEYE, O. O.; OPEOLU, B. O.; JACKSON, V. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. **Environmental Management**, v. 60, n. 4, p. 758–783, 1 out. 2017.

BRANDÃO, T. A. S. et al. Chapter Nine - Probing the mechanism of flavin action in the oxidative decarboxylation catalyzed by salicylate hydroxylase. Em: RICHARD, J. P.; MORAN, G. R. (Eds.). **New Experimental Probes for Enzyme Specificity and Mechanism**. Methods in Enzymology. Academic Press, 2023. v. 685p. 241–277.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, p. 331–338, 1993.

COSTA, D. M. A. et al. Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase salicylate hydroxylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 588–600, 15 maio 2019.

CROZIER-REABE, K.; MORAN, G. R. Form follows function: Structural and catalytic variation in the class a flavoprotein monooxygenases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 15601–15639, 23 dez. 2012.

DENG, M. C. et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 83, n. 1, p. 79–86, 15 jun. 2014.

DONG, J. et al. Biokatalytische Oxidationsreaktionen - aus der Sicht eines Chemikers. **Angewandte Chemie**, v. 130, n. 30, p. 9380–9404, 20 jul. 2018.

EPPINK, M. H. M.; SCHREUDER, H. A.; VAN BERKEL, W. J. H. Interdomain binding of NADPH in p-Hydroxybenzoate Hydroxylase as Suggested by Kinetic, Crystallographic and Modeling Studies of Histidine 162 and Arginine 269 Variants*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 273, n. 33, p. 21031–21039, 14 ago. 1998.

GAN, S.; LAU, E. V.; NG, H. K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 532–549, 30 dez. 2009.

GHOSAL, D. et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, 31 ago. 2016.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1, p. 1–15, 30 set. 2009.

HELLMANN, N.; SCHNEIDER, D. Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure. Em: **Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc., 2019. v. 1958p. 379–401.

HUIJBERS, M. M. E. et al. Flavin dependent monooxygenases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 544, p. 2–17, 15 fev. 2014.

JOHN MCMURRY. Biomoléculas: aminoácidos, péptidos y proteínas. Em: **Química Orgánica**. 7. ed. México, D.F.: Cengage Learning Editores, S.A., 2008. v. 1p. 1016–1059.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 1, p. 71–84, 13 abr. 2005.

JORDAN, R. E.; PAYNE, J. R. Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment: a literature review and synopsis. United States: Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, MI, 1980.

KATAGIRI, M. et al. **Flavin Adenine Dinucleotide Requirement for the Enzymic Hydroxylation and Decarboxylation of Salicylic Acid**. p. PC2413–PC2414, jul. 1962.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006.

MALLICK, S.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, T. K. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 64–90, 26 fev. 2011.

MANENDA, M. S. et al. Structural analyses of the Group A flavin-dependent monooxygenase PieE reveal a sliding FAD cofactor conformation bridging out and in conformations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 14, p. 4709–4722, 3 abr. 2020.

MONTERSINO, S. et al. Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase uncovers lipid-assisted flavoprotein strategy for regioselective aromatic hydroxylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 36, p. 26235–26245, 6 set. 2013.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9385–9395, 18 abr. 2014.

PALFEY, B. A.; MCDONALD, C. A. Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 1, p. 26–36, 1 jan. 2010.

PAUL, C. E. et al. Flavoprotein monooxygenases: Versatile biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 51, n. 107712, p. 1–25, 1 nov. 2021.

PAUL, C. E.; GUARNERI, A.; BERKEL, W. J. H. Flavoprotein Monooxygenases and Halogenases. Em: **Flavin-Based Catalysis**. Wiley, 2021. p. 169–199.

PENG, R.-H. et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 32, p. 927–955, 25 jul. 2008.

PEREIRA, M. S. et al. The role of remote flavin adenine dinucleotide pieces in the oxidative decarboxylation catalyzed by salicylate hydroxylase. **Bioorganic Chemistry**, v. 119, n. 105561, p. 1–10, 1 fev. 2022.

ROBBINS, W. K.; HSU, C. S. Petroleum, Composition. Em: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2000. p. 1–17.

SEO, J. S.; KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 1, p. 278–309, 13 jan. 2009.

SOTA, M. et al. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 4057–4067, jun. 2006.

SOUZA, E. R.; SIGOLI, F. A. PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E MODELOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA INTER E INTRAMOLECULAR. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1841–1847, 2012.

SPEIGHT, J. G. **Handbook of Petroleum Product Analysis**. Wiley, 2015.

SROGI, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 169–195, 22 mar. 2007.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular fluorescence: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2012.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, dez. 2003.

VAN VRANKEN, D.; WEISS, G. A. Protein Function. Em: **Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology**. 1st. ed. New York: Garland Science, 2012. p. 229–277.

WALTERS, C. Petroleum. Em: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Wiley, 2020. p. 1–44.

WANG, J. et al. Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase. **PNAS**, v. 99, n. 2, p. 608–613, 22 jan. 2002.

WICK, A. F. et al. Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review Environmental Soil Science, Wetland Restoration and Mined Land Reclamation. Em: **Environmental Soil Science, Wetland Restoration and Mined Land Reclamation**. p. 1–102.

YANG, H. et al. Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 262–266, 10 out. 2003.

ANEXOS

Figura S 1 Correção do efeito de filtro interno nas titulações fluorométricas da mutante D314A (1 μ M) com FAD (0 – 70 μ M), tampão HEPES 56 mM, 200 mM NaCl e 1,1 mM EDTA (I = 0,2)..	75
.....	
Tabela S 1 Correção do parâmetro cinético k_{cat} para as mutantes de NahG considerando o grau de saturação parcial de FAD, NADH e salicilato a 25 °C e pH 8,5, I = 0,2 M (NaCl). ...	75
Tabela S 2 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (308 μ M) catalisada pela NahG E38A na presença de salicilato (259 μ M) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C.....	76
Tabela S 3 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (80 μ M) e salicilato (259 μ M) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C.....	77
Tabela S 4 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (80 μ M) e NADH (300 μ M) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C.....	78
Tabela S 5 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (304 μ M) catalisada pela NahG D314A na presença de salicilato (256 μ M) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C.....	79
Tabela S 6 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μ M) e salicilato (244 μ M) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C.	80
Tabela S 7 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μ M) e NADH (305 μ M) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C..	81
Tabela S 8 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (300 μ M) catalisada pela NahG R111Q na presença de salicilato (250 μ M) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C.....	82
Tabela S 9 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (21 μ M) e salicilato (250 μ M) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C..	83
Tabela S 10 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (21 μ M) e NADH (300 μ M) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C.	84
Tabela S 11 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG nativa FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.	85
Tabela S 12 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG R111Q FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm..	86
Tabela S 13 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG R111Q FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.	87

Tabela S 14 Intensidades de fluorescência (F) de uma solução de Triptofano (13 μ M) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.	88
Tabela S 15 Intensidades de fluorescência normalizada e corrigida pelo efeito de filtro interno (F_{corr}) para a formação do complexo NahG E38A FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm (Exp 1) e 290 (Exp 2).	89
Tabela S 16 Intensidades de fluorescência (F) de uma solução de Triptofano (13 μ M) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.	90
Tabela S 17 Intensidades de fluorescência normalizada e corrigida pelo efeito de filtro interno (F_{corr}) para a formação do complexo NahG D314A FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.	91
Tabela S 18 Coeficientes angulares (slope) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (20 μ M), NADH (300 μ M) e salicilato (259 μ M) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C.	92
Tabela S 19 Coeficientes angulares (slope) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μ M), NADH (300 μ M) e salicilato (250 μ M) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C.	93
Tabela S 20 Coeficientes angulares (slope) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (20 μ M), NADH (300 μ M) e salicilato (250 μ M) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C.	94

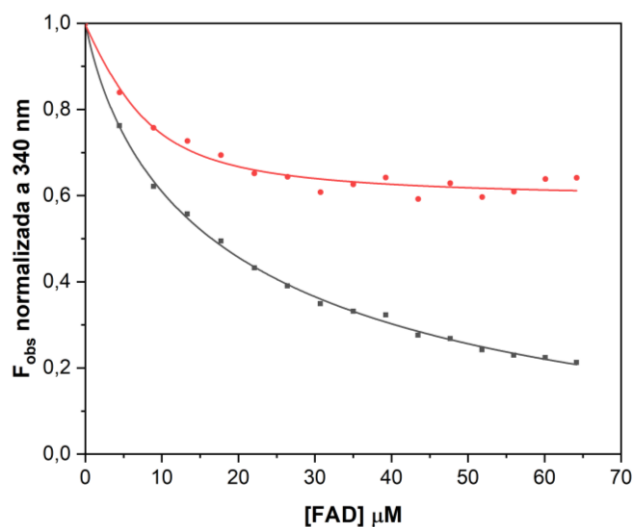


Figura S 1 Correção do efeito de filtro interno nas titulações fluorométricas da mutante D314A (1 μM) com FAD (0 – 70 μM), tampão HEPES 56 mM, 200 mM NaCl e 1,1 mM EDTA ($I = 0,2$). Excitação em 292 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 10 e 5 nm respectivamente. Fluorescência normalizada a 340 nm em função da concentração de FAD e ajustes usando a equação (2) para dados corrigidos pelo efeito de filtro interno (linha vermelha) e sem correção por efeito de filtro interno (linha preta).

Tabela S 1 Correção do parâmetro cinético k_{cat} para as mutantes de NahG considerando o grau de saturação parcial de FAD, NADH e salicilato a 25 °C e pH 8.5, $I = 0,2$ M (NaCl). Os erros são desvios padrão.

Enzima	$\chi_{\text{E}\cdot\text{FAD}}$	$\chi_{\text{E}\cdot\text{NADH}}$	$\chi_{\text{E}\cdot\text{sal}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{ap}}$	$k_{\text{cat}}^{\text{a}}$
NahG E38A	0,88	0,81	0,83	7,8	13 ± 1
NahG D314A	0,91	0,96	0,97	3,0	$3,5 \pm 0,1$
NahG R111Q ^b	0,94	0,95	0,98	0,009	$0,0104 \pm 0,0004$

^a valor estimado considerando $k_{\text{cat}} = k_{\text{cat}}^{\text{ap}} / \chi_{\text{E}\cdot\text{FAD}} \chi_{\text{E}\cdot\text{NADH}} \chi_{\text{E}\cdot\text{sal}}$.

^b Força iônica não ajustada para 0,2 M com NaCl.

Tabela S 2 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (308 μM) catalisada pela NahG E38A na presença de salicilato (259 μM) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), $I = 0,2$ M (NaCl), e 25 °C. Cada replicação é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
1,5	0,0393	0,0424
2,6	0,0718	-
4,8	0,0975	0,1065
9,6	0,172	0,154
15,2	0,216	0,181
28,2	0,298	0,260
37,5	0,322	0,274
46,8	0,344	0,294
56,1	0,360	0,299
65,4	0,384	0,353
74,7	0,372	-
84,0	0,389	0,347
100,8	0,391	-
119,4	0,385	0,358

^a [NahG] = 0,0614 μM ; ^b [NahG] = 0,0612

Tabela S 3 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (80 μM) e salicilato (259 μM) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[NADH] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
4,6	0,0174	0,0197
10,2	0,0340	-
23,1	0,0700	0,0876
32,3	0,0858	0,117
41,5	0,120	0,148
65,03	0,1578	-
83,1	0,192	0,241
139,3	0,258	0,280
175,3	0,277	0,336
213,6	0,303	0,358
306,6	0,342	0,403
399,5	0,358	-
406,0	-	0,404
461,4	-	0,421
498,3	-	0,421

^a [NahG] = 0,0604 μM ; ^b [NahG] = 0,0653

Tabela S 4 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (80 μM) e NADH (300 μM) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[Salicilato] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
0,95	0,0224	0,0378
3,8	0,0491	0,0580
7,4	0,0607	-
9,1	0,0661	0,0707
11,4	0,0798	0,100
22,4	0,137	-
38,1	0,198	-
57,1	-	0,272
83,3	0,310	0,333
109,5	0,346	0,354
166,6	0,406	0,417
219,0	0,405	-

^a [NahG] = 0,0659 μM ; ^b [NahG] = 0,0675

Tabela S 5 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (304 μM) catalisada pela NahG D314A na presença de salicilato (256 μM) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), $I = 0,2$ M (NaCl), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
0,87953	0,053	-
3,15953	0,107	-
4,07153	0,116	-
4,98353	0,127	-
7,26353	0,148	-
9,61496	-	0,153
12,42353	0,198	-
15,19496	-	0,196
16,42353	0,208	-
20,42353	0,236	-
24,42353	0,240	-
28,21496	-	0,208
32,42353	0,269	-
37,51496	-	0,255
40,42353	0,278	-
46,81496	-	0,261
48,42353	0,300	-
56,11496	-	0,270
65,41496	-	0,293
74,71496	-	0,304
84,01496	-	0,304

^a [NahG] = 0,0602 μM ; ^b [NahG] = 0,0612

Tabela S 6 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μM) e salicilato (244 μM) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[NADH] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
5,3	0,0680	0,0580
10,6	0,114	-
21,3	0,166	-
30,2	0,180	-
39,9	-	0,199
57,0	0,211	-
85,5	0,213	0,214
133,0	0,219	0,213
171,2	0,235	-
218,5	0,209	0,242
304,1	0,219	0,215

^a [NahG] = 0,0609 μM ; ^b [NahG] = 0,0597

Tabela S 7 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μM) e NADH (305 μM) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[Salicilato] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
0,86	0,0137	0,0256
1,7	0,0520	0,0414
3,5	0,0752	0,0662
4,9	0,0682	0,0771
6,7	0,102	0,105
8,1	0,104	0,0907
8,2	0,121	0,126
10,3	0,125	0,131
20,3	0,149	0,142
32,3	0,156	0,159
46,4	0,158	0,167
70,6	0,159	0,172
92,8	0,168	0,173
141,3	0,167	0,172
185,7	0,168	0,177

^a [NahG] = 0,0600 μM ; ^b [NahG] = 0,0613

Tabela S 8 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH (300 μM) catalisada pela NahG R111Q na presença de salicilato (250 μM) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
0,53	0,00198	0,00192
1,1	0,00245	-
2,1	0,00334	0,00338
3,2	0,00387	0,00345
4,3	0,00396	0,00363
5,3	0,00447	0,00444
7,3	0,00460	0,00478
10,3	0,00492	0,00489
12,5	0,00582	0,00559
14,2	0,00564	0,00554
20,3	0,00635	0,00678
21,4	0,00582	0,00589
30,3	0,00647	0,00654
41,0	0,00725	-

^a [NahG] = 0,762 μM ; ^b [NahG] = 0,758

Tabela S 9 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (21 μM) e salicilato (250 μM) sob concentrações crescentes de NADH a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[NADH] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
5,3	0,00122	-
10,5	0,00184	-
20,2	0,00219	-
30,7	0,00253	-
40,4	0,0025	-
53,5	0,00251	-
57,0	0,00370	-
76,0	0,00423	0,00365
123,5	-	0,00400
161,5	0,00441	0,00471
209,0	0,00458	0,00463
302,2	-	0,00528
304,0	0,00516	-
399,3	-	0,00576
507,2	-	0,00566
604,4	0,00598	-
605,8	-	0,00520
801,8	0,00562	0,00574

^a [NahG] = 0,720 μM ; ^b [NahG] = 0,716

Tabela S 10 Velocidades iniciais (v) para a oxidação de NADH catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (21 μM) e NADH (300 μM) sob concentrações crescentes de salicilato a pH 8,5 (Tris 56 mM), e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[Salicilato] μM	v $\mu\text{M s}^{-1}$	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
0	0	0
0,81	0,00108	0,00264
1,6	0,00307	0,00305
3,2	0,00350	0,00280
4,6	0,00389	0,00374
5,3	-	0,00402
6,1	0,00416	-
8,1	0,00407	0,00443
10,1	0,00501	0,00479
15,7	0,00484	-
16,1	-	0,00566
20,2	0,00598	-
21,0	0,00561	0,00554
30,2	0,00548	0,00582
45,9	0,00609	0,00581
60,3	0,00576	0,00623
91,8	0,00647	0,00635
120,7	0,00597	0,00602

^a [NahG] = 0,721 μM ; ^b [NahG] = 0,743

Tabela S 11 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG nativa FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.

[FAD] μM	[FAD] μM após diluição	F. lida a 340 nm ^a	F. corrigida após diluição	F. normalizada
0	0	750,76	750,76	1,00000
0,24	0,24	575,96	577,88	0,76973
0,48	0,48	469,96	473,10	0,63016
0,72	0,71	364,19	367,84	0,48995
0,96	0,95	299,59	303,59	0,40438
1,2	1,18	269,01	273,50	0,36429
1,44	1,41	246,63	251,56	0,33507
1,68	1,64	240,49	246,10	0,32780
1,92	1,87	230,93	237,08	0,31579
2,16	2,10	219,45	226,03	0,30107
2,4	2,32	222,50	229,92	0,30625
2,64	2,55	221,43	229,55	0,30575
2,88	2,77	208,14	216,47	0,28833
3,12	2,99	208,96	218,01	0,29039
3,36	3,21	206,33	215,96	0,28765
3,6	3,43	199,64	209,62	0,27922

^a [NahG] = 1,001 μM

Tabela S 12 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG R111Q FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μ M após diluição	Exp 1 ^a		Exp 2 ^b	
	F. lida a 340 nm	F. normalizada	F. lida a 340 nm	F. normalizada
0	772,13	1,00	754,50	1,00
0,24	530,92	0,69	582,92	0,78
0,48	311,98	0,41	411,26	0,55
0,71	220,07	0,29	279,17	0,37
0,95	198,77	0,26	237,36	0,32
1,18	181,57	0,24	214,61	0,29
1,41	172,79	0,23	216,76	0,29
1,64	176,39	0,23	198,74	0,27
1,87	164,37	0,22	205,44	0,28
2,10	163,11	0,22	195,19	0,27
2,32	170,76	0,23	200,08	0,27
2,55	161,49	0,22	185,88	0,26
2,77	164,96	0,22	198,09	0,27
2,99	153,23	0,21	197,37	0,27
3,21	159,59	0,22	179,13	0,25
3,43	152,87	0,21	178,97	0,25

^a [NahG] = 1,003 μ M; ^a [NahG] = 1,002 μ M

Tabela S 13 Intensidades de fluorescência (F) para a formação do complexo NahG R111Q FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μ M após diluição	Exp 3 ^c	
	F. lida a 340 nm	F. normalizada
0	854,21	1,00
0,24	616,14	0,72
0,48	392,43	0,46
0,71	260,17	0,31
0,95	210,18	0,25
1,18	205,96	0,25
1,41	186,46	0,22
1,64	182,29	0,22
1,87	190,15	0,23
2,10	175,06	0,21
2,32	183,17	0,22
2,55	177,22	0,22
2,77	162,27	0,20
2,99	161,50	0,20
3,21	165,51	0,20
3,43	166,95	0,21

^c [NahG] = 1,006 μ M

Tabela S 14 Intensidades de fluorescência (F) de uma solução de Triptofano (13 μM) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.

[FAD] μM	[FAD] μM após diluição	Exp 1	
		F. lida a 340 nm	CF
0,0	0	600,89	1,00
4,8	4,79	563,40	0,94
9,6	9,55	503,30	0,84
14,4	14,288	482,06	0,81
19,2	18,98	452,60	0,76
24,0	23,65	401,95	0,68
28,8	28,28	379,46	0,64
33,7	32,89	365,13	0,62
38,5	37,47	370,65	0,63
43,3	42,01	344,71	0,59
48,1	46,53	318,19	0,55
52,9	51,02	294,59	0,51
57,7	55,48	283,20	0,49
62,5	59,91	262,68	0,46
67,3	64,31	247,18	0,43
72,1	68,70	234,67	0,41

Tabela S 15 Intensidades de fluorescência normalizada e corrigida pelo efeito de filtro interno (F_{corr}) para a formação do complexo NahG E38A FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), $I = 0,2$ M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm (Exp 1) e 290 (Exp 2). Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μ M após diluição	Exp 1 ^a		Exp 2 ^b	
	F. lida a 340 nm	F_{corr}	F. lida a 340 nm	F_{corr}
0	787,37	1,00	975,48	1,00
4,79	533,02	0,72	653,81	0,72
9,55	404,91	0,61	540,31	0,67
14,288	339,85	0,54	438,79	0,58
18,98	296,64	0,50	366,47	0,51
23,65	253,76	0,48	331,02	0,53
28,28	231,29	0,47	288,19	0,50
32,89	200,40	0,42	267,12	0,48
37,47	187,50	0,39	234,46	0,42
42,01	167,48	0,37	230,99	0,46
46,53	147,35	0,35	212,04	0,46
51,02	143,98	0,37	182,76	0,42
55,48	137,03	0,37	173,96	0,42
59,91	128,80	0,37	151,61	0,40
64,31	114,70	0,35	153,32	0,45
68,70	104,69	0,34	124,64	0,38

^a [NahG] = 1,000 μ M; ^b [NahG] = 1,001 μ M

Tabela S 16 Intensidades de fluorescência (F) de uma solução de Triptofano (13 μM) sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), I = 0,2 M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm.

[FAD] μM	[FAD] μM após diluição	Exp 1	
		F. lida a 340 nm	CF
0,00	0,00	656,73	1,00
4,49	4,48	617,76	0,94
8,99	8,93	574,22	0,88
13,48	13,35	532,23	0,82
17,98	17,74	496,08	0,77
22,47	22,10	468,09	0,72
26,96	26,43	436,98	0,68
31,46	30,74	430,68	0,67
35,95	35,02	378,42	0,59
40,45	39,27	353,73	0,55
44,94	43,49	347,96	0,55
49,43	47,68	322,14	0,51
53,93	51,85	298,70	0,47
58,42	55,99	284,23	0,45
62,91	60,11	276,56	0,44
67,41	64,20	249,42	0,40

Tabela S 17 Intensidades de fluorescência normalizada e corrigida pelo efeito de filtro interno (F_{corr}) para a formação do complexo NahG D314A FAD, sob concentrações crescentes de FAD a pH 8,5 (Hepes 56 mM, EDTA 1,1 mM), $I = 0,2$ M (NaCl), e 25 °C, excitação em 292 nm. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

[FAD] μ M após diluição	Exp 1 ^a		Exp 2 ^b	
	F. lida a 340 nm	F_{corr}	F. lida a 340 nm	F_{corr}
0	772,60	1,00	756,08	1,00
4,79	563,03	0,77	566,67	0,80
9,55	469,61	0,70	462,39	0,70
14,288	413,13	0,66	395,76	0,65
18,98	365,50	0,63	367,56	0,64
23,65	329,95	0,60	325,02	0,60
28,28	298,80	0,58	291,71	0,58
32,89	285,71	0,56	263,95	0,53
37,47	263,47	0,59	247,04	0,57
42,01	235,29	0,57	241,14	0,59
46,53	235,11	0,57	218,29	0,54
51,02	211,10	0,56	202,35	0,55
55,48	194,66	0,55	183,03	0,53
59,91	201,56	0,60	183,70	0,56
64,31	185,67	0,57	172,68	0,54
68,70	169,01	0,58	151,52	0,53

^a [NahG] = 1,001 μ M; ^b [NahG] = 1,006 μ M

Tabela S 18 Coeficientes angulares (*slope*) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG E38A na presença de FAD (20 μM), NADH (300 μM) e salicilato (259 μM) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

λ (nm)	<i>Slope</i> (s^{-1})		λ (nm)	<i>Slope</i> (s^{-1})	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b		Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
380	0,2768	0,2990	310	0,7972	0,8953
379	0,2927	0,3005	309	0,8459	0,9268
378	0,3105	0,3039	308	0,8649	0,8354
377	0,3533	0,3359	307	0,9244	0,8868
376	0,3098	0,3718	306	0,8245	1,0547
375	0,3937	0,4545	305	0,9597	0,8961
374	0,4205	0,5331	304	0,8394	1,0114
373	0,4161	0,4600	303	0,8696	0,9064
372	0,4849	0,4585	302	0,8259	0,9549
371	0,4812	0,5968	301	0,7301	0,8885
370	0,4924	0,6739	300	0,7948	0,8291

^a [NahG] = 0,060 μM ; ^b [NahG] = 0,060 μM

Tabela S 19 Coeficientes angulares (*slope*) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG D314A na presença de FAD (20 μM), NADH (300 μM) e salicilato (250 μM) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

λ (nm)	10^3 Slope (s^{-1})		λ (nm)	10^3 Slope (s^{-1})	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b		Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
380	0,2697	0,2793	310	0,9327	1,0315
379	0,3010	0,2971	309	0,9755	1,1094
378	0,3284	0,3481	308	0,9211	0,8098
377	0,4049	0,3918	307	0,8048	0,9251
376	0,4055	0,4376	306	0,9593	0,9832
375	0,4324	0,4295	305	0,9093	0,9567
374	0,4559	0,4996	304	0,7944	0,9096
373	0,4717	0,4951	303	0,9359	0,9223
372	0,5029	0,5540	302	0,8925	1,0139
371	0,4745	0,6355	301	0,7709	0,8998
370	0,5456	0,5738	300	0,8484	0,8914

^a [NahG] = 0,060 μM ; ^b [NahG] = 0,060 μM

Tabela S 20 Coeficientes angulares (*slope*) em diferentes comprimentos de onda para a reação catalisada pela NahG R111Q na presença de FAD (20 μM), NADH (300 μM) e salicilato (250 μM) para avaliar a extensão de reação desacoplada. Condições: pH 8,5 (Tris 56 mM) e 25 °C. Cada replica é um novo experimento em relação à enzima e as soluções preparadas.

λ (nm)	10^6 Slope (s^{-1})		λ (nm)	10^6 Slope (s^{-1})	
	Exp 1 ^a	Exp 2 ^b		Exp 1 ^a	Exp 2 ^b
380	3,17	3,05	310	1,58	6,14
379	3,44	3,71	309	1,68	6,46
378	4,03	3,77	308	9,53	6,97
377	4,03	3,95	307	2,80	3,85
376	4,26	3,97	306	1,77	3,33
375	4,43	3,85	305	2,31	4,69
374	4,84	4,28	304	1,38	4,96
373	5,26	5,09	303	5,96	2,13
372	5,76	6,73	302	2,06	3,53
371	5,22	6,30	301	1,95	2,78
370	6,61	6,90	300	1,05	2,57

^a [NahG] = 0,722 μM ; ^b [NahG] = 0,720 μM