



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**MECANISMO DE CATÁLISE E DINÂMICA PROTÉICA DA  
ENZIMA SALICILATO HIDROXILASE**

**Stefanya Velásquez Gómez**

**Belo Horizonte**  
***Outubro de 2015***

**UFMG/ICEX/DQ.1120<sup>a</sup>**

**D.616<sup>a</sup>**

**Stefanya Velásquez Gómez**

**MECANISMO DE CATÁLISE E DINÂMICA PROTÉICA DA  
ENZIMA SALICILATO HIDROXILASE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química (área de concentração: Química Orgânica) da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química-Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão

**Belo Horizonte**

***Outubro de 2015***

V434m Velasquez Gomez, Stefanya  
2015 Mecanismo de catálise e dinâmica protéica da enzima  
D salicilato hidroxilase [manuscrito] / Stefanya  
Velasquez Gomez. 2015.  
115 f. : il.

Orientador: Tiago Antônio da Silva Brandão.

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

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Enzimas - Teses 3.  
Proteínas - Teses 4. Salicilatos - Teses 5. Catálise -  
Teses I. Brandão, Tiago Antônio da Silva, Orientador  
II. Título.

CDU 043



## "Mecanismo de Catálise e Dinâmica Protéica da Enzima Salicilato Hidroxilase"

**Stefanya Velasquez Gomez**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Tiago Antonio da Silva Brandão - Orientador  
UFMG

Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem  
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende  
UFMG

Belo Horizonte, 03 de novembro de 2015.



Aminha mãe Consuelo, com muito amor.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Tiago Brandão, pelo entusiasmo em ensinar e o grande suporte durante a realização desse trabalho.

À minha família pelo seu amor incondicional.

À Isabel por sua companhia e amizade durante estes anos (já a considero como uma irmã).

Ao Miguel pelo seu amor, companhia, paciência e compreensão.

Às minhas duas grandes amigas Luisa e Vanessa que apesar da grande distância, ainda conto com todo o carinho delas.

Aos meus grandes professores de português Mozart e “Hyvelainne” que me acolheram como parte da família e me trataram como uma brasileira, por sua amizade e paciência ao me ensinar o português (principalmente quando tentaram explicar a diferença entre doce, dose e doze).

Aos meus amigos e colegas do laboratório LCMR pela compreensão, cuidados e por todo o carinho.

Aos colegas do laboratório Biologia Estrutural do ICB / UFMG pelo seu grande apoio e contribuição para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelo acesso às linhas de luz SAXS

Aos membros da banca examinadora, titulares e suplentes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

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

"We must become the change we want to see."

Mahatma Gandhi

## RESUMO

Neste trabalho buscou-se caracterizar a enzima salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* cepa G7 em relação a sua dinâmica proteica e mecanismo de catálise. Essa enzima participa da via de degradação do naftaleno, sendo uma monooxigenase flavodependente que catalisa, ao custo de NADH e O<sub>2</sub>, a descarboxilação oxidativa do ácido salicílico (AS) para originar catecol.

A análise de dados estruturais obtidos por espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) mostrou que a NahG não ligada a FAD sofreu uma contração estrutural em relação a holoenzima. No mesmo sentido, a titulação fluorimétrica revelou que a ligação do FAD foi seguida por uma forte supressão da fluorescência em 340 nm e um aumento do rendimento quântico em 524 nm, sugerindo que resíduos de triptofano sofrem uma mudança de meio e próximos ao FAD produziram transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET).

Na determinação de parâmetros cinéticos para a NahG observou-se que os valores de  $K_m$  para FAD e O<sub>2</sub> são da ordem de concentração utilizada de enzima, indicando que a reação entre O<sub>2</sub> e flavina para formar um complexo C4a-hidroperoxiflavina foi altamente favorável. Desses resultados observou-se que a etapa determinante de velocidade de reação deve ser posterior a qualquer evento de formação da C4a-hidroperoxiflavina.

Os dados cinéticos em função do pH para as enzimas nativas e mutantes H110N e H322Y indicam que duas isoformas catalisam a reação de descarboxilação oxidativa do ácido salicílico na NahG. A desprotonação ou mutação dos resíduos de histidina favorece a catálise, mas diminuem a afinidade da NahG pelo AS. Os perfis de Log  $k_{cat}$  em função do pH mostram três constantes de ionização, duas dessas constantes foram atribuídas a H110 e ao grupo peroxila da C4a-hidroperoxiflavina. Os estudos cinéticos com NahG nativa utilizando como substratos os ácidos salicílicos substituídos mostraram um formato curvo para o perfil de Hammett com Log  $k_{cat}$ . Isso indicou mudança da etapa determinante da velocidade de reação, que ocorre por um mecanismo tipo substituição eletrofílica aromática (S<sub>E</sub>Ar).

*Palavras-chave:* mecanismo; dinâmica; enzima; salicilato hidroxilase; descarboxilação oxidativa; ácido salicílico.

## ABSTRACT

The goal of this study was to characterize the enzyme salicylate hydroxylase (NahG) of *Pseudomonas putida* strain G7 regarding its protein dynamics and mechanism of catalysis. This enzyme is aflavine-dependent monooxygenase participating in the naphthalene degradation pathway at cost of NADH and O<sub>2</sub> catalyzing the oxidative decarboxylation of salicylic acid (SA) to yield catechol.

The analysis of the structural data obtained by small angle X-ray scattering (SAXS) showed that NahG unbound to FAD has undergone a structural contraction relative to the holoenzyme. Likewise, fluorimetric titration revealed that FAD binding was followed by strong suppression of the fluorescence at 340nm and increased of the quantum yield at 524 nm, suggesting that tryptophan residues underwent a change in their environment and near to FAD produced fluorescence resonance energy transfer (FRET).

The  $K_m$  values for FAD and O<sub>2</sub> are within the order of enzyme concentration used in the experiment as determined by kinetic parameters for NahG, indicating that the reaction between O<sub>2</sub> and FAD to form the C4a-hydroperoxiflavine complex was highly favorable. These results suggested that the rate-determining step occur after any event of C4a-hydroperoxiflavine formation.

The kinetic data as a function of pH for the native and mutants (H110N and H322Y)NahG indicated the participation of two isoforms in the catalysis of the oxidative decarboxylation reaction of salicylic acid. The deprotonation or mutation of these histidine residues promoted catalysis, whereas decreased the affinity of NahG by AS. The Log  $k_{cat}$ -pH profiles showed three ionization constants, two of these constants were attributed to H110 and the peroxy group of C4a-hydroperoxiflavine. Kinetic studies for substituted salicylic acids showed a curved Hammett profile for log  $k_{cat}$ . This indicated change of the rate-determining step of the reaction, which occurs by an electrophilic aromatic substitution (S<sub>E</sub>Ar) type mechanism.

**Keywords:** mechanism; dynamics; enzymes; salicylate hydroxylase; oxidative decarboxylation; salicylic acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de orbitais moleculares para o dióxigênio nos estados tripleto ( $3\Sigma_g^-$ ) e singleto ( $1\Sigma_g^+$ e $1\Delta_g$ ).....	4
Figura 2. Cofatores envolvidos na ação de oxigenases.....	6
Figura 3. Conformações importantes na catálise por PHBH.....	15
Figura 4. Substratos avaliados neste trabalho.....	19
Figura 6. Cromatograma das purificações por afinidade da NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y) utilizando a coluna HisTrap™ HP 5 mL (GE Healthcare).....	23
Figura 7. Cromatograma das purificações por exclusão molecular da NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y) utilizando a coluna HiloLoad™ 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Inseto: Curva de calibração de log MM versus $V_e$ ou $K_{AV}$ .....	25
Figura 8. (a) Eletroforese SDS-Gel em acrilamida contendo 12 % de bis-acrilamida a 100 V após revelação com <i>Comassie Blue</i> ; (b) Perfil eletroforético de padrões proteicos de massa molar conhecida (Canaleta A).....	26
Figura 9. Espectros de UV-Vis para as proteínas NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y).....	27
Figura 10. Curvas cinéticas da reação de conversão de ácido salicílico (concentração indicada no gráfico) em catecol.....	31
Figura 11. Resposta da intensidade de fluorescência em 472 nm em função da concentração de NADH.....	32
Figura 12. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando a dinâmica da alça de ligação do FAD (Alça FAD).....	34
Figura 13. Ilustração sobre o funcionamento básico do SAXS.....	36
Figura 14. Curvas experimentais de espalhamento de raios-X em solução de apo NahG na ausência e presença de FAD.....	37
Figura 15. Função de distribuição de pares de distâncias obtida a partir das curvas de espalhamento da apo NahG na ausência e presença de FAD.....	41
Figura 16. Modelos de átomos fictícios ( <i>Dummy Atom Model</i> ) gerados para apo NahG na ausência e presença de FAD.....	42
Figura 17. Sobreposição entre os modelos obtidos por SAXS e por difração de raios-X para apo 6xHis-NahG.....	43

Figura 18. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando a resíduos importantes na dinâmica da alça de ligação do FAD(Alça FAD).....	45
Figura 19. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando resíduos importantes possivelmente relacionados com a dinâmica da alça de ligação do FAD (Alça FAD) e do grupo isoaloxazina do FAD.....	46
Figura 20. Espectros de fluorescência em concentrações crescentes de FAD na ausência (a) e presença (b) de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.....	47
Figura 21. Intensidade de fluorescência (F) em concentrações crescentes de FAD em 340 nm (a) e 524 nm (b) na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.....	48
Figura 22. Intensidade relativa de fluorescência ( $F_o/F_c$ ) em função da concentração de FAD na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.....	49
Figura 23. Posição de resíduos de triptofano na estrutura de raios-x da NahG.....	50
Figura 24. Dados de fluorescência em concentrações crescentes de AS em soluções de holo NahG em pH 8,0 a 25 °C.....	51
Figura 25. Curva de velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico para a conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG ao custo de NADH em pH 8,5 e 25 °C.....	54
Figura 26. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico (A), dioxigênio (B), FAD (C) e NADH (D) para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	57
Figura 27. Efeito do pH sobre $\text{Log } k_{\text{cat}}$ para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pela NahG nativa a 25 °C.....	58
Figura 28. Efeito do pH sobre $K_m$ para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pela NahG nativa a 25 °C.....	58
Figura 29. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando os resíduos de histidina mutados na NahG.....	61
Figura 30. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG H110N em pH 8,5 e 25 °C.....	63
Figura 31. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG H322Y em pH 8,5 e 25 °C.....	64
Figura 32. Efeito do pH sobre $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pelas NahG H110N (A) e H322Y (B) a 25 °C.....	66

Figura 33. Comparação do pH sobre $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ para as reações de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pelas NahG nativa e mutantes a 25 °C.....	67
Figura 34. Velocidade de reação em função da concentração de ácidos salicílicos substituídos na posição 4 para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	71
Figura 35. Velocidade de reação em função da concentração de ácidos salicílicos substituídos na posição 5 para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	72
Figura 36. $\text{Log } k_{\text{cat}}$ em função dos parâmetros de Hammett para a reação de descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos na posição 4 catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	75
Figura 37. $\text{Log } k_{\text{cat}}$ em função dos parâmetros de Hammett para a reação de descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos na posição 5 catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	76

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formas de inserção de oxigênio em compostos químicos.....	1
Esquema 2. Reação catalisada pela pirocatecase.....	3
Esquema 3. Mecanismo proposto para ação de monooxigenases metaloproteicas.....	7
Esquema 4. Formas oxidada, semi- e totalmente reduzidas em riboflavinas.....	8
Esquema 5. Mecanismo de catálise proposto para monooxigenases flavodependentes.....	10
Esquema 6. Mecanismos de ativação de dioxigênio em monooxigenases flavodependentes. ....	11
Esquema 7. Exemplos de reações de inserção de oxigênio catalisadas pela C4a-hidroperoxiflavina em monooxigenases flavodependentes.....	12
Esquema 8. Via de conversão do naftaleno em piruvato e acetil coenzima A na bactéria <i>Pseudomonas putida</i> da cepa G7 ( <i>PpG7</i> ).....	14
Esquema 9. Caminhos reacionais relacionados a atividade de NahG.....	15
Esquema 10. Mecanismo de catálise proposto para NahG.....	18
Esquema 11. Modelo cinético completo para a reação de uma enzima (E) com um substrato (S).....	53
Esquema 12. Modelo cinético simplificado de catálise enzimática considerando a determinação das constantes cinéticas pelo método de velocidades iniciais.....	53
Esquema 13. Caminho reacional e espécies envolvidas na ação catalítica da NahG nativa.....	59
Esquema 14. Equilíbrio ácido-base para grupos imidazóis em resíduos de histidina.....	61
Esquema 15. Mecanismo proposto para a catálise da enzima NahG sobre a descarboxilação de ácidos salicílicos substituídos.....	77
Esquema 16. Efeito de substituintes na descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa molar (MM), antes e após a clivagem por TEV, e absorvidade molar ( $\epsilon$ ) em 280 nm para a NahG nativa e mutantes H110N e H322Y.....	22
Tabela 2. Proporções estequiométricas entre apo NahG e FAD utilizada na obtenção das curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	36
Tabela 3. Valores de $R_g$ obtidos para apo NahG na ausência e presença de FAD e dados relacionados as medidas de SAXS.....	40
Tabela 4. Valores de $V_c$ obtidos para apo NahG na ausência e presença de FAD.....	41
Tabela 5. Valores de $K_{SV}$ em 340 nm e 524 nm obtidos a partir do aumento da concentração de FAD na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.....	49
Tabela 6. Parâmetros cinéticos para ácido salicílico, dioxigênio, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	60
Tabela 7. Parâmetros cinéticos e de equilíbrio para a reação de descaboxilação oxidativa de ácido salicílico pela enzima NahG a 25,0 °C.....	61
Tabela 8. Parâmetros cinéticos para ácido salicílico, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas NahG H110N e H322Y em pH 8,5 e 25 °C.....	64
Tabela 9. Parâmetros cinéticos e de equilíbrio para a reação de descaboxilação oxidativa de ácido salicílico pelas NahG H110N e H322Y a 25,0 °C.....	67.
Tabela 10. Parâmetros cinéticos para os ácidos salicílicos substituídos na posição 4, para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	73.
Tabela 11. Parâmetros cinéticos para os ácidos salicílicos substituídos na posição 5, para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.....	73.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(EC)	<i>Enzyme Commission number</i> - número EC
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia (do inglês, <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
LUMO	Orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (do inglês, <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
PQQ	Pirroloquinolina Quinona
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Fosfato Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
PHM	Peptidilglicina $\alpha$ -hidroxilante Monooxigenase
MMO	Metano mono-oxigenase
ADP	Adenosina Difosfato
HPAH	<i>p</i> -Hidroxifenilacetato Hidroxilase
HAPs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PHBH	<i>p</i> -Hidroxibenzoato Hidroxilase
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo
S <sub>E</sub> Ar	Substituição Eletrofílica Aromática
NahG	Salicilato hidroxilase
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
R <sub>g</sub>	Raio de Giro
DAM	Modelo de átomos fictícios - <i>Dummy Atom Model</i>
3HB6H	3-Hidroxibenzoato 6-hidroxilase
TIF	Transformada Indireta de Fourier
As	Ácido salicílico
RLEL	Relação Linear de Energia Livre
I	Força iônica
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
H110N	Mutante de histidina 110 para tirosina
H322Y	Mutante de histidina 322 para Asparagina
H226A	Mutante de histidina 226 para alanina

### Nomenclatura de aminoácidos utilizando o código de uma e três letras

<b>Aminoácido</b>	<b>Código de três letras</b>	<b>Código de uma letra</b>
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

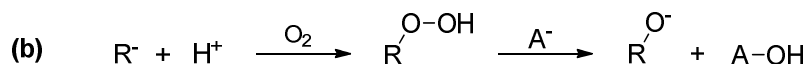
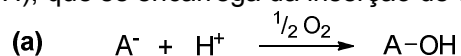
# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Oxigenases	2
1.2	Monooxigenases flavodependentes	8
1.3	Salicilato hidroxilase (NahG)	13
1.4	Justificativa do trabalho	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1	Reagentes	21
3.2	Purificação e caracterização da NahG nativa e mutantes	21
3.2.1	Expressão da 6xHis-NahG nativa e mutantes	22
3.2.2	Purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular	23
3.2.3	Clivagem com a protease TEV para remoção da cauda 6xHis	24
3.3	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	27
3.4	Determinação das constantes de ligação por fluorimetria	28
3.5	Experimentos cinéticos	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
4.1	Dinâmica proteica da NahG: Estudos de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)	33
4.2	Determinação das constantes de ligação de FAD e ácido salicílico (AS) na NahG nativa utilizando titulação fluorimétrica	47
4.3	Estudos cinéticos da NahG nativa e mutantes: Determinação de parâmetros cinéticos e análise do mecanismo de reação	53
4.3.1	Parâmetros cinéticos básicos e estudos em função do pH para a NahG nativa	53
4.3.2	Parâmetros cinéticos básicos e estudos em função do pH para as NahG mutantes H110N e H332Y	62
4.3.3	Avaliação da demanda eletrônica na catálise da NahG nativa	70
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A inserção de oxigênio em uma molécula orgânica é uma etapa importante em diversas reações de oxidação. De fato, o termo oxidação, como originalmente cunhado, representa a combinação com o oxigênio.<sup>1</sup>Embora, como sabemos, a definição de oxidação, bem mais abrangente, represente o aumento do número de oxidação de um átomo ao passo que outro átomo tenha seu número de oxidação diminuído (uma redução).<sup>1-2</sup>Seguindo a problemática deste trabalho, no estudo da reação de oxigênio com ácido salicílico e derivados, a inserção de oxigênio a partir do dióxigênio (O<sub>2</sub>) pode seguir vias direta ou indireta, que indicam, especificamente, que O<sub>2</sub> reage diretamente com o substrato ou leva à formação de um intermediário reativo que se encarregará da sua inserção (Esquema 1).<sup>2</sup>

**Esquema 1. Formas de inserção de oxigênio em compostos químicos.** Em (a) está apresentada a inserção direta, que envolve a reação bimolecular de O<sub>2</sub> com um substrato (A<sup>-</sup>). Em (b), está apresentado um exemplo de inserção indireta que envolve um intermediário reativo (ROOH), que se encarrega da inserção de oxigênio no substrato (A<sup>-</sup>).



Fonte: o autor

De modo prático, embora a reação apreciável entre dois substratos possa ser inevitável devido a sua característica cinética e termodinâmica, a oxidação desejável leva a um aumento de polaridade do produto, afetando suas características físico-químicas (solubilidade, pontos de fusão e ebulição, etc.). Além disso, a inserção de oxigênio em uma molécula orgânica propicia um sítio para modificações químicas futuras, visto que o oxigênio, um átomo eletronegativo, causa polarização em ligações químicas.

Diversos são os exemplos de inserção direta de oxigênio em química. A oxidação do eteno (ou etileno) para epóxi-etano, também conhecido por óxido de etileno ou oxirano, é produzido industrialmente da reação com dióxigênio sob temperaturas de 200 a 300 °C e pressões de 10 a 30 atm. Esse processo é catalisado por prata e representa cerca de 11% da demanda mundial por eteno, face à importância do epóxi-etano como matéria prima na produção de inúmeros materiais.<sup>3</sup> Outro exemplo está na produção industrial de fenol, produzido na sua maior parte

pela a oxidação do cumeno (isopropilbenzeno) com inserção de oxigênio em um processo em duas etapas. Na primeira etapa, o cumeno reage com O<sub>2</sub> a 77-117 °C e 1-7 atm para render um hidroperóxido. Finalmente, esse hidroperóxido decompõe na presença de ácido sulfúrico a 40-100 °C para render fenol e propanona. Deste processo, seis toneladas de propanona são produzidas para cada dez toneladas de fenol. De modo que, para atingir eficiência econômica, ambos os produtos devem ser vendidos concomitantemente pelo fabricante, de fato um grande problema, visto que a demanda mundial por fenol é bem superior.<sup>4,5</sup>

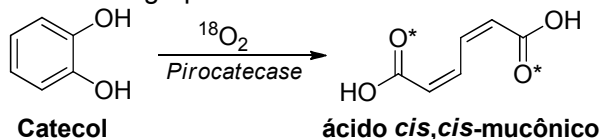
Outros processos químicos de inserção de oxigênio serão apresentados mais à frente neste trabalho, mas como se pode antecipar pelos exemplos acima, a inserção de oxigênio demanda condições drásticas de temperatura e pressão ou a necessidade de catalisadores muito eficientes. A inserção seletiva de oxigênio é outra questão importante que depende, invariavelmente, de especificidade dirigida pelo substrato ou pelo catalisador. Seja na velocidade seja na especificidade, de modo geral, nenhum catalisador desenvolvido pelo homem atingiu a capacidade de uma enzima, catalisadores centrais em sistemas biológicos capazes de acelerar reações por fatores tão elevados quando 10<sup>23</sup> vezes.<sup>6</sup> Dessa forma, não é surpreendente o interesse no entendimento de como enzimas catalisam suas reações seja por uma razão puramente acadêmica ou tecnológica.<sup>7</sup> Nesse âmbito está nosso interesse no estudo da enzima salicilato hidroxilase (NahG), uma oxigenase que participa da via metabólica de degradação do naftaleno em *Pseudomonas putida*.

## 1.1 Oxigenases

Aquelas enzimas dotadas com a função de inserção de oxigênio em substratos formam a classe de oxigenases (EC 1.13 e 1.14), que são parte do grupo de oxidoreductases de acordo com o *Enzyme Commission number* (número EC).<sup>8</sup> As formas de catálise de enzimas da classe de oxigenases dependem de cofatores diversos e podem seguir mecanismos de reação bem diferentes entre si.<sup>9</sup> As oxigenases podem ser classificadas em duas subclasses, monooxigenases e dioxigenases, que se diferenciam pela capacidade de inserção de um ou dois átomos de oxigênio por molécula de substrato, respectivamente, e são referenciadas nesta ordem pelos EC 1.13 e 1.14.<sup>8, 10</sup>

As oxigenases são ubíquas em organismos aeróbios, participando desde o metabolismo de nutrientes e hormônios até o metabolismo de compostos antropogênicos.<sup>11</sup> Essas enzimas foram descobertas por Osamu Hayaishi em 1955 que, durante o estudo do metabolismo do triptofano, isolou uma dioxigenase capaz de catalisar a reação de conversão do catecol em ácido *cis,cis*-mucônico (Esquema 2), que foi posteriormente denominada pirocatecase.<sup>12</sup> Um importante achado do estudo de Hayaishi foi observado na incubação de catecol e pirocatecase na presença de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  ou  $^{18}\text{O}_2$ , tendo sido observado que ambos os átomos de oxigênio de  $^{18}\text{O}_2$  haviam sido inseridos no produto. Na época acreditava-se que a oxidação biológica ocorria unicamente com a remoção de elétrons ou átomos de hidrogênio do substrato, sem a participação direta de  $\text{O}_2$ .<sup>13</sup>

**Esquema 2. Reação catalisada pela pirocatecase.** Em 1955, Osamu Hayaishi observou que a pirocatecase, uma dioxigenase, catalisava a inserção de ambos os átomos de oxigênio de  $^{18}\text{O}_2$  na conversão do catecol em ácido *cis,cis*-mucônico.<sup>12</sup> Um átomo de oxigênio era inserido para cada grupo ácido carboxílico, presentes no oxigênio carbonílico ou hidroxílico, de acordo com a ressonância no grupo.

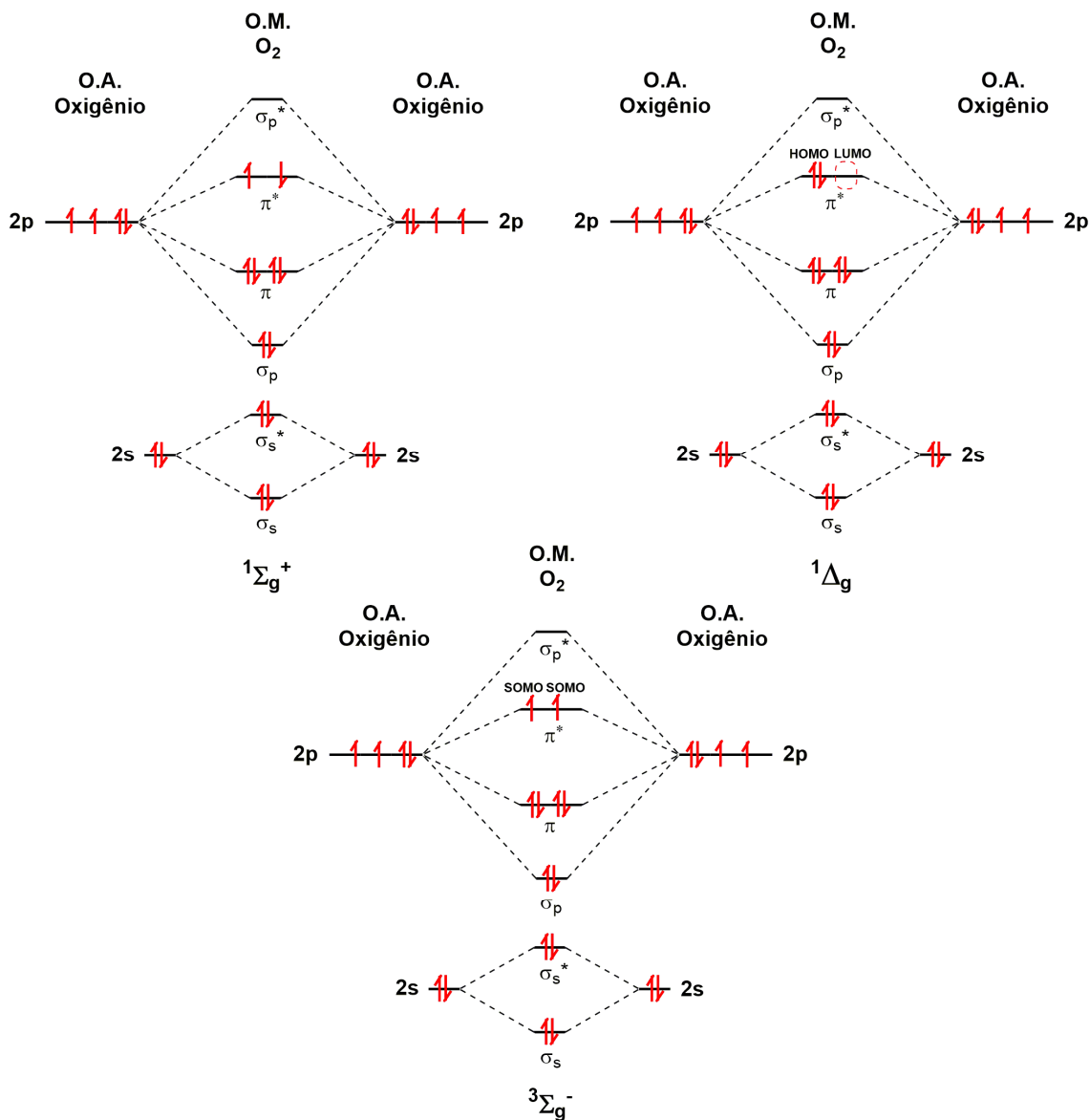


Fonte: o autor.

Contudo, a grande maioria das oxigenases depende de cofatores para a catálise de suas reações. Embora, a oxidação de compostos orgânicos por  $\text{O}_2$  são exotérmicas em sua maioria, visto que a soma das energias de ligação formadas, C-O (90 kcal/mol) e O-H (110 kcal/mol), são inferiores em relação a soma das energias de ligação rompidas, C-C(80 kcal/mol), C-H (95 kcal/mol) e O-O (120 kcal/mol no  $\text{O}_2$ ), a adição de oxigênio em um substrato orgânico é proibida por spin. Isto se deve ao fato que o  $\text{O}_2$  no estado fundamental tem dois elétrons desemparelhados no orbital de mais alta energia, um estado tripleto  $^3\Sigma_g^-$  (Figura 1), e geralmente os compostos orgânicos se encontram no estado singleto, com todos os elétrons emparelhados no estado fundamental. Portanto, uma reação entre uma molécula no estado tripleto e outra no estado singleto é proibida por spin e desfavorecida cineticamente<sup>2</sup>. Contudo, a reação poderia acontecer com uma molécula de oxigênio no estado singleto, mas embora esta reação não seja proibida por spin, as energias dos estados singleto  $^1\Sigma_g^+$  e  $^1\Delta_g$  do oxigênio são,

respectivamente, 158 e 94 kJ/mol mais elevadas do que do estado tripleto  ${}^3\Sigma_g^-$ , sendo assim, pouco acessíveis.

**Figura 1. Diagrama de orbitais moleculares para o dioxigênio nos estados tripleto ( ${}^3\Sigma_g^-$ ) e singleto ( ${}^1\Sigma_g^+$  e  ${}^1\Delta_g$ ).** Observe que os três estados diferem somente em relação à ocupância e estados de spin dos elétrons nos dois orbitais antiligantes degenerados  $\pi^*$ , sendo que o estado  ${}^3\Sigma_g^-$  apresenta dois orbitais HOMO e o estado singleto  ${}^1\Delta_g$  apresenta um orbital LUMO.

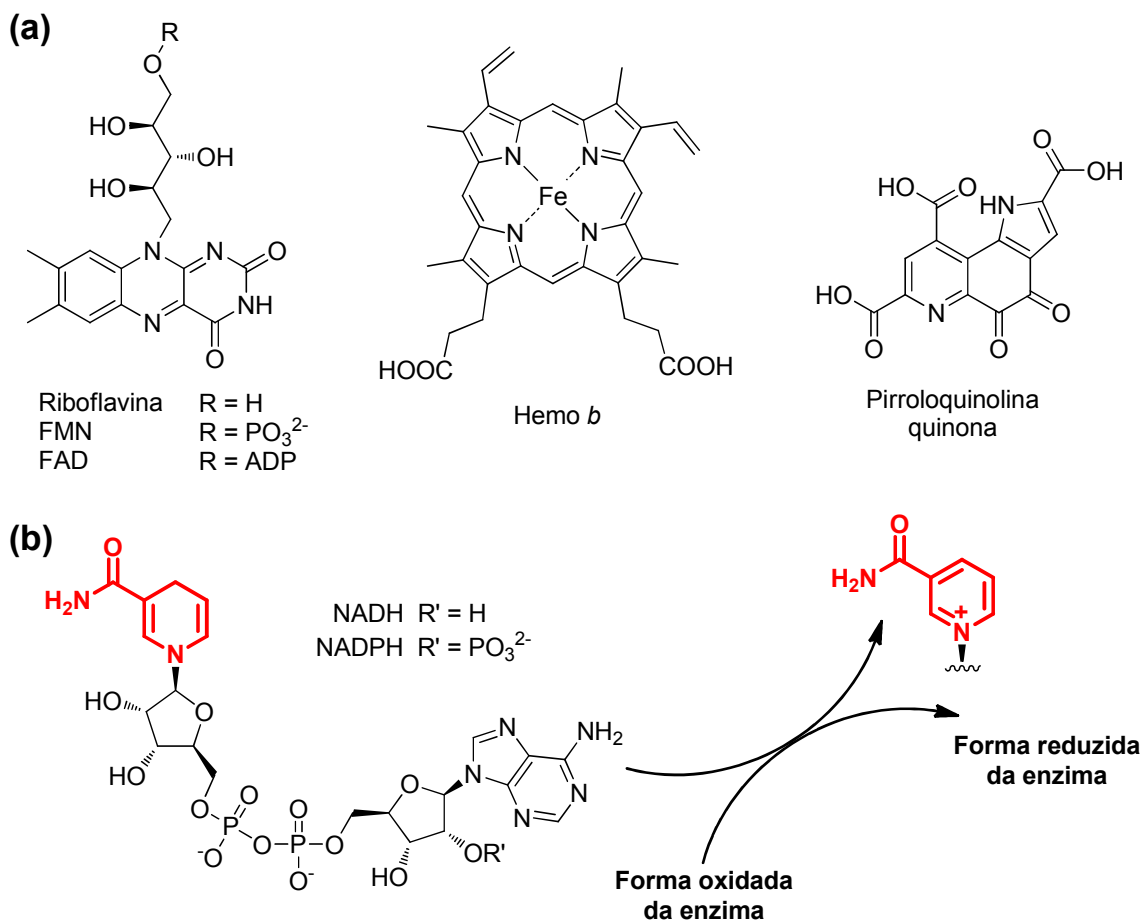


Fonte: o autor.

Assim, a grande maioria das oxigenases caracterizadas até o momento, com algumas poucas exceções,<sup>14</sup> necessitam de um cofator para ativar o dioxigênio e, assim, realizar a reação de inserção do oxigênio, uma etapa crítica na reação catalisada por essas enzimas.<sup>15</sup> Dentre os cofatores empregados por enzimas estão íons de metais de transição (Fe e Cu) e grupo hemo nas metaloenzimas, ou então, cofatores puramente orgânicos como asflavinas (nas oxigenases flavodependentes), representadas pela riboflavina, FMN (Flavina Mononucleotídeo) e FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), ou ainda a pirroloquinolina quinona (PQQ), entre outros.<sup>16</sup> A ligação desses cofatores é usualmente muito forte, com afinidades na ordem de nanomolar.<sup>9</sup> Nesses casos, os cofatores podem ser considerados como grupos prostéticos, visto que permanecem fortemente ligados à enzima como uma parte importante de sua estrutura. Outros cofatores importantes na ação de oxigenases são as espécies reduzidas de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADH) e de seu derivado fosforilado NADPH, requeridos para a redução dos cofatores diretamente envolvidos na ativação do O<sub>2</sub>. O NADH e NADPH apresentam afinidades muito mais baixas pela enzima, frequentemente funcionando como moeda de troca de elétrons entre diferentes proteínas.<sup>17</sup> A Figura 2 ilustra as estruturas desses cofatores, conjuntamente com estrutura das formas reduzidas e oxidadas do NADH e NADPH, mostrando o envolvimento de dois elétrons por meio do grupo nicotinamida.

Na ativação de oxigênio por algumas metaloenzimas, não é difícil conceber que os íons de Fe, Cu e Mn, com elétrons desemparelhados nos seus orbitais *d*, apresentam características eletrônicas adequadas para interagir com o dioxigênio tripleto. Os intermediários reativos formados são utilizados na inserção de oxigênio no substrato. Exemplos são as monooxigenases metaloproteicas hemo-dependentes, não-hemo ferro-dependentes e cobre-dependentes.<sup>18</sup>

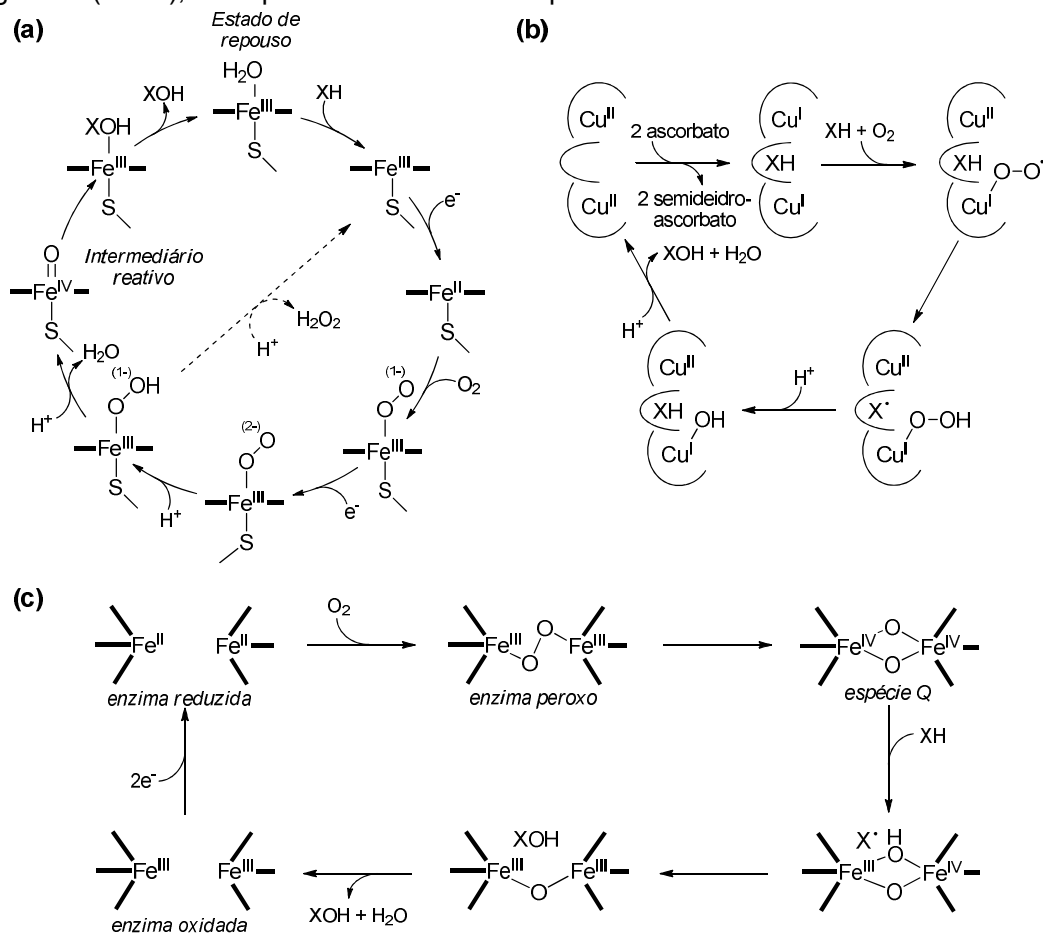
**Figura 2. Cofatores envolvidos na ação de oxigenases.** Em (a) esta as estruturas químicas de grupos prostéticos típicos. Em (b) as estruturas das formas reduzidas e oxidadas do NADH e NADPH com a porção nicotinamida aparece em vermelho em vermelho.



Fonte: o autor.

O mecanismo de ação das hemo-dependentes, também referidas como citocromo P450, envolve a transferência de um elétron do substrato XH para o grupo hemo com a redução do íon Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup>. Subsequentemente, dioxigênio liga-se ao grupo hemo resultando em um complexo *oxi*-P450. Esse complexo é reduzido por um segundo elétron e, após uma dupla protonação do átomo de oxigênio distal, a ligação O-O é clivada, resultando no intermediário enzimático reativo com um íon Fe<sup>4+</sup>. Esse intermediário é responsável pela inserção do átomo de oxigênio do substrato, que permanece ligado ao íon Fe<sup>3+</sup> formado na reação até que seja substituído por uma molécula de água, originando o estado de repouso da enzima. Esse ciclo, dito produtivo, contrasta com a reação não-produtiva (ou desacoplada) que leva ao decaimento de um intermediário reativo para um estado oxidado com formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproduto (Esquema 3a).<sup>19</sup>

**Esquema3. Mecanismo proposto para ação de monooxigenases metaloproteicas.** Em (a) citocromo P450 (CYP), uma hemo-dependente típica;<sup>19</sup> (b) peptidilglicina  $\alpha$ -hidroxilante monooxigenase (PHM), uma representante cobre-dependente;<sup>20</sup> (c) metano monooxigenase (MMO), uma típica não-hemo ferro-dependente.<sup>21</sup>



Fonte: modificado de Torres Pazmiño *et al.*, 2010.<sup>18</sup>

As monooxigenases cobre-dependentes formam uma classe relativamente pequena de enzimas, sendo comumente encontradas em organismos eucarióticos. Na enzima peptidilglicina  $\alpha$ -hidroxilante monooxigenase (PHM), que catalisa a hidroxilação ao custo de um equivalente de dioxigênio, ambos íons Cu<sup>2+</sup> do sítio ativo são reduzidos a Cu<sup>+</sup> por dois equivalentes de ascorbato. Após a ligação do substrato, dioxigênio é reduzido por um dos íons Cu<sup>+</sup> formando uma espécie cobre-peróxido, responsável pela inserção do oxigênio no substrato (Esquema 3b).<sup>20</sup>

Entre as monooxigenases não-hemo ferro-dependentes destaca-se as metano monooxigenases (MMO), que apresentam um centro dinuclear ferro-ferro coordenado a quatro resíduos de glutamato e dois resíduos de histidinas. O dioxigênio é ativado mediante ligação com o sítio Fe<sup>2+</sup>-Fe<sup>2+</sup> rendendo, após passar

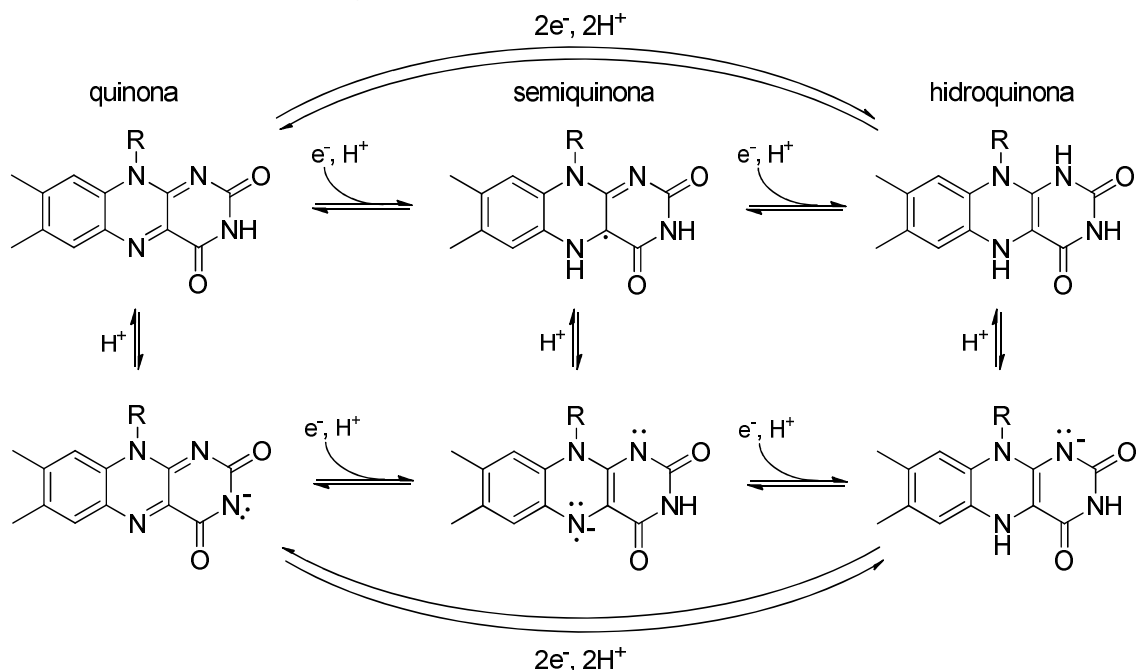
por um complexo peroxo, uma espécie reativa diferro(IV)-bis- $\mu$ -oxo (espécie Q). Essa espécie participa da inserção do oxigênio no substrato (Esquema 3c).<sup>21</sup>

Dentre as não-metaloproteínas, as flavodependentes são certamente o grupo mais abundante de oxigenases. A seguir focamos especificamente nas monooxigenases flavodependentes, classe em que se encaixa *asalicilato hidroxilase* (*NahG*).

## 1.2 Monooxigenases flavodependentes

Essas enzimas são as que utilizam as coenzimas flavinas, representadas pela riboflavina, FMN (Flavina Mononucleotídeo) e FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), para catalisar a inserção no substrato de um átomo de oxigênio do dióxigênio enquanto o outro é reduzido para formar água.<sup>22</sup> A porção ativa das flavinas é o anel tricíclico isoaloxazina, que sofre redução reversível recebendo um ou dois elétrons em um processo em duas etapas ou dois elétrons simultaneamente; cada qual carreando um hidrogênio (Esquema4). O nome flavina provém do latim *flavus*, que significa "amarelo", a cor característica em solução aquosa de moléculas deste grupo quando na forma oxidada, que apresenta uma ligação dupla a mais e, conseqüentemente, maior conjugação eletrônica, que a observada na forma reduzida incolor. Formas intermediárias são a forma semi-reduzida aniônica e semi-reduzida neutra (radical semiquinona) com colorações vermelho e azul, respectivamente.<sup>23</sup>

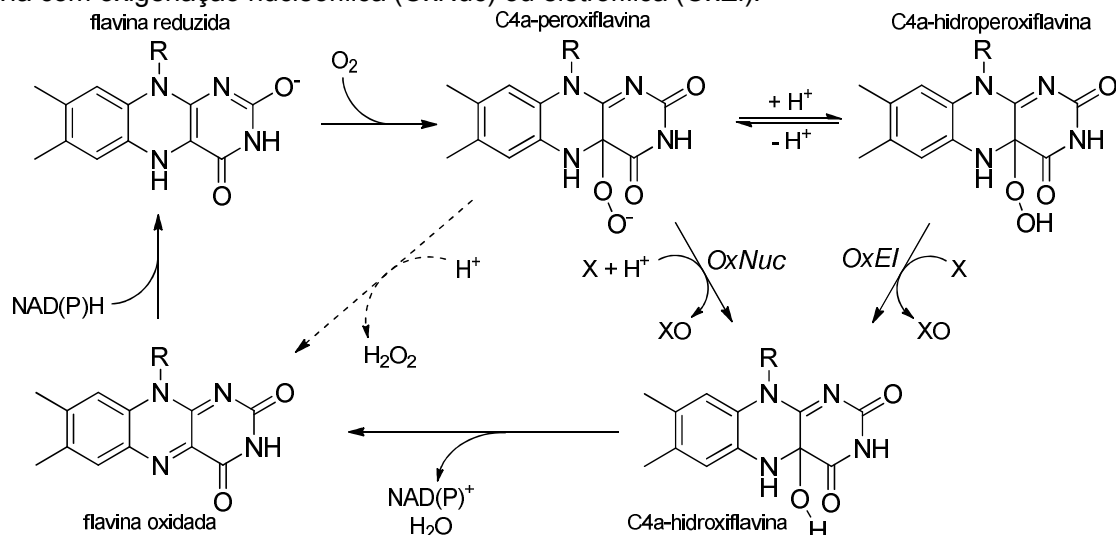
**Esquema4. Formas oxidada, semi- e totalmente reduzidas em riboflavinas.** O grupo R difere nas riboflavinas: hidrogênio para riboflavina;  $\text{PO}_3^{2-}$  para FMN; e ADP para FAD.



Fonte: o autor.

A flavina é a chave para catálise nas monooxigenases flavodependentes, visto que consegue romper a barreira de spin que existe entre a reação de uma molécula orgânica e  $\text{O}_2$ . O intermediário reativo é uma espécie peroxoflavina com uma ligação covalente formada pela reação do dioxigênio com o carbono C4a da flavina reduzida. Dependendo do estado de protonação, este intermediário pode levar a uma oxigenação nucleofílica ou eletrofílica. Embora esse intermediário seja relativamente estável, ele decai para a forma oxidada da flavina na ausência de um substrato apropriado, rendendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  como subproduto. Após a monooxigenação do substrato, a C4a-hidroxi-flavina reage para render a flavina oxidada com  $\text{H}_2\text{O}$  como um subproduto (Esquema5).<sup>17</sup>

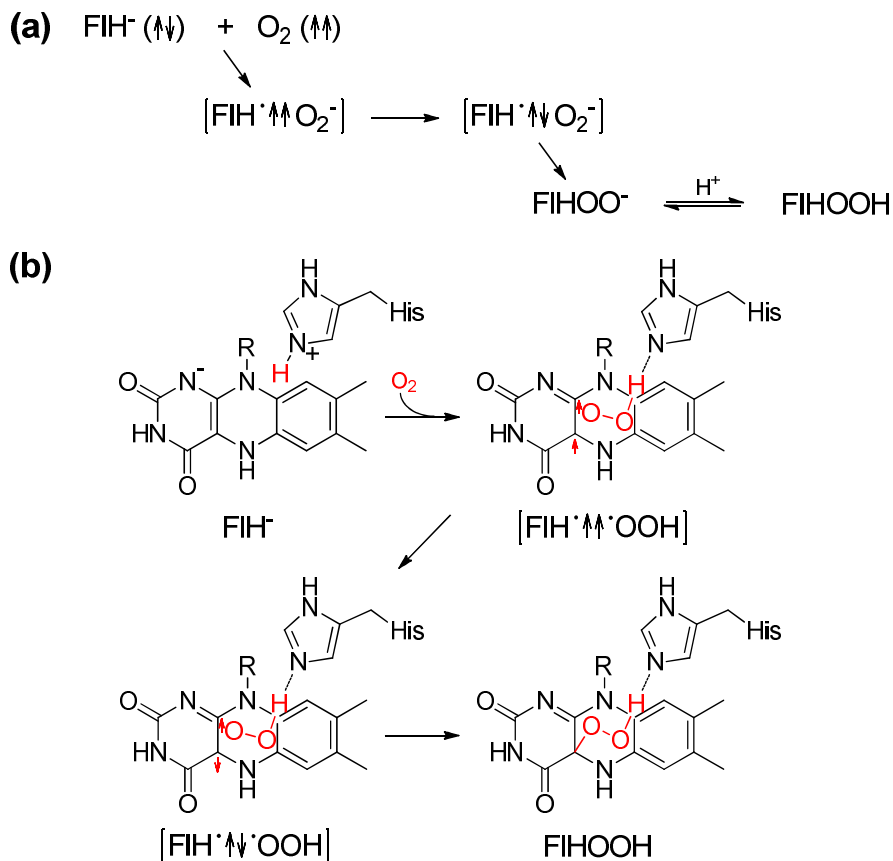
**Esquema5. Mecanismo de catálise proposto para monooxigenases flavodependentes.** Os intermediários peroxiflavina podem reagir com o substrato por uma via com oxigenação nucleofílica (OxNuc) ou eletrofílica (OxEI).<sup>17</sup>



Fonte: modificado de W.J.H. van Berkelet *et al.*, 2006.<sup>17</sup>

A reação entre a flavina reduzida e dióxigênio é fortemente acelerada em oxigenases por fatores tipicamente superiores a  $10^4$  vezes em relação a ausência de enzima ( $\sim 250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ).<sup>24</sup> A constante de formação de C4a-hidroperoxiflavina para a maioria das oxigenases está entre  $10^4$  a  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , por exemplo,  $8,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para fenol hidroxilase,<sup>25</sup>  $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para *p*-hidroxibenzoato hidroxilase<sup>26</sup> e  $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase<sup>27</sup> e *p*-hidroxifenilacetato hidroxilase (HPAH).<sup>28</sup> O caminho convencional para ativação de oxigênio proposto por Bruice<sup>29</sup> e Massey<sup>30</sup> envolve a transferência de um elétron da flavina para o dióxigênio. Um estado tripleto é formado ( $\text{FIH}^{\cdot-}:\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dessa reação, que é seguida pela transição de spin para um estado singleto diradical de camada aberta ( $\text{FIH}^{\cdot-}:\text{O}_2^{\cdot}$ ) antes de reagir para o formar uma ligação covalente entre o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e a flavina (Esquema 6a). Estudos têm mostrado que um resíduo positivamente carregado próximo ao carbono C4a da flavina é um fator importante para facilitar a ativação de oxigênio nas flavoenzimas<sup>31</sup> Por exemplo, *nap*-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase ( $\text{C}_2$ )<sup>32</sup> e na piranose 2-oxidase ( $\text{P}_2\text{O}$ )<sup>33</sup> uma histidina conservada (H396 e H548 em  $\text{C}_2$  e  $\text{P}_2\text{O}$ , respectivamente) tem sido proposta como um ácido-geral na transferência de um elétron da flavina para o dióxigênio (Esquema 6b). Esse mecanismo tem sido chamado de transferência de elétrons próton-acoplada (PCET, do inglês *Proton-Coupled Electron Transfer*).<sup>34</sup>

**Esquema 6. Mecanismos de ativação de dioxigênio em monooxigenases flavodependentes.** Em (a) o mecanismo envolvendo uma espécie radical superóxido;<sup>30</sup> (b) mecanismo de transferência de elétrons próton-acoplada envolvendo uma espécie radical hidroperóxido.<sup>34</sup>



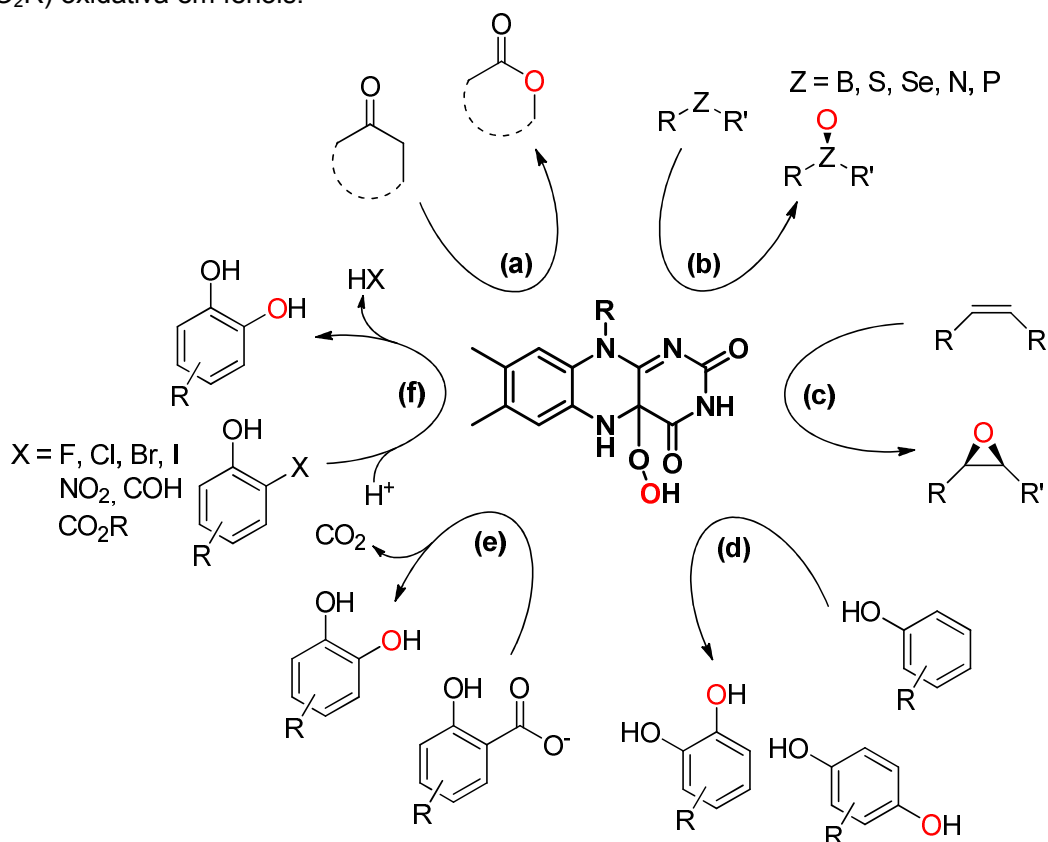
Fonte: modificado de Massey, 1994<sup>30</sup> e Visitsatthawong et al., 2015<sup>34</sup>.

Estudos da reação catalisada por HAPH, em pH 7 a 4 °C, mostram que a formação da C4 $\alpha$ -hidroperoxiflavina é favorecida na ausência do substrato *p*-hidroxifenilacetato (HPA), exibindo uma constante de 1,1 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> em relação a sua presença com uma constante de 4,8 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; a reação de HPA leva a formação de 3,4-diidroxifenilacetato.<sup>28</sup> A eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de C4 $\alpha$ -peroxiflavina em HAPH e na ausência do substrato é relativamente lenta com uma constante de 0,003 s<sup>-1</sup>.<sup>35</sup>

A C4 $\alpha$ -hidroperoxiflavina é uma espécie versátil para inserção de oxigênio em moléculas orgânicas, de modo que não é surpreendente o elevado interesse nas aplicações biotecnológicas de monooxigenases flavodependentes, que podem, ainda, apresentar promiscuidade em relação a seus substratos.<sup>29, 36</sup> O Esquema 7

ilustra algumas reações catalisadas por essas enzimas. Por exemplo, a oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas é conhecida desde a metade do século passado.<sup>37</sup> Essa reação tem se mostrado possível, inclusive, para aldeídos que são convertidos nos seus respectivos ésteres formílicos.<sup>38</sup> Sulfoxidação enantioespecífica tem sido possível também, bem como a oxidação de outros heteroátomos (selênio, boro, nitrogênio e fósforo).<sup>39,40</sup> Epoxidação estereoseletiva de duplas ligações (olefinas) também tem sido realizada, sendo um campo emergente na aplicação biotecnológica dessas enzimas.<sup>27, 41</sup> A hidroxilação regioseletiva tem sido observada nas posições *orto* ou *para* de diversos fenóis.<sup>42</sup> Essa reação pode ser, ainda, acoplada à descarboxilação e desalogenação oxidativa em fenóis,<sup>43,44,45</sup> que sabidamente ocorrem para a salicilato hidroxilase (NahG), enzima estudada neste trabalho.

**Esquema 7. Exemplos de reações de inserção de oxigênio catalisadas pela C4a-hidroperoxiflavina em monooxigenases flavodependentes:**(a) oxidação de Baeyer-Villiger em cetonas;<sup>37</sup> (b) oxigenação de heteroátomos;<sup>39</sup> (c) epoxidação de olefinas;<sup>46</sup> (d) hidroxilação *orto* ou *para* em fenóis;<sup>42</sup> (e) descarboxilação oxidativa em fenóis<sup>44</sup> (f) desalogenação (F, Cl Br e I), desnitrificação (NO<sub>2</sub>), desformilação (COH) e desesterificação (CO<sub>2</sub>R) oxidativa em fenóis.<sup>47</sup>



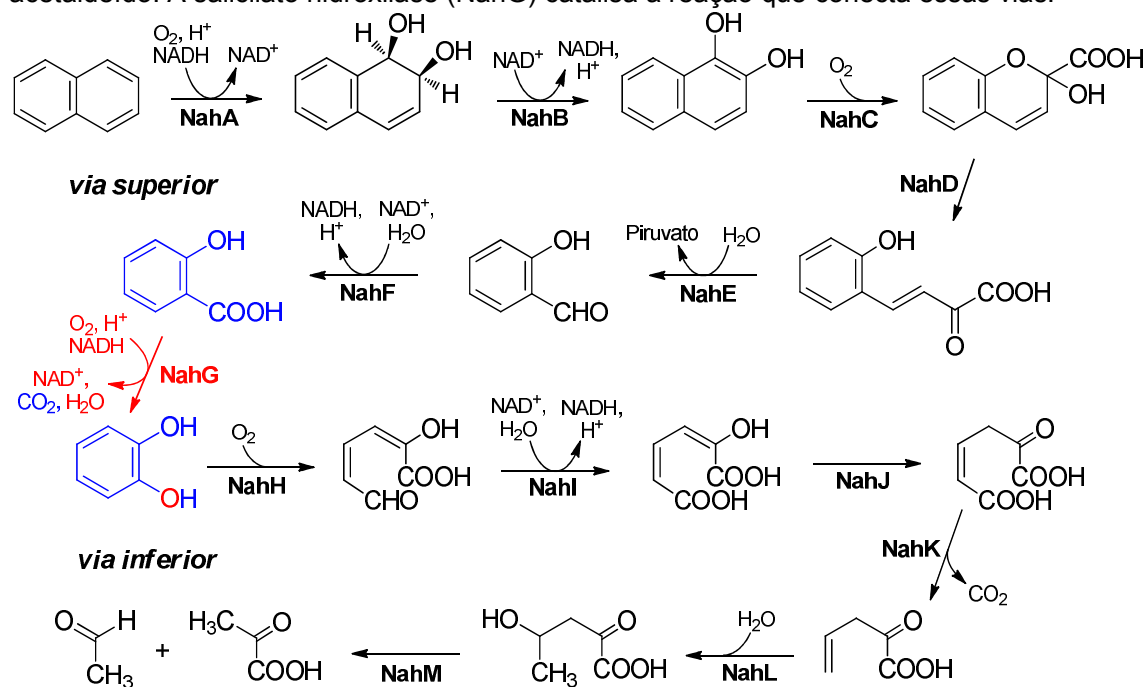
Fonte: o autor conforme o Esquema 2 em Holtmannet *al.*, 2014.<sup>47</sup>

### 1.3 Salicilato hidroxilase (NahG)

A salicilato hidroxilase, EC 1.14.13.1, estudada neste trabalho é proveniente da bactéria *Pseudomonas putida* da cepa G7 (*PpG7*), que contém um plasmídeo denominado NAH7, que codifica enzimas capazes de degradar o naftaleno de modo eficiente.<sup>48</sup> Essas enzimas são agrupadas em duas vias: superior e inferior. A via superior corresponde à conversão do naftaleno em salicilato e a via inferior envolve a conversão do salicilato em piruvato e acetaldeído (Esquema 8).<sup>49</sup> Esse processo é de interesse para a biorremediação de compostos aromáticos policíclicos (HAPs), componentes importantes do petróleo, sendo comum a alguns poucos microorganismos e de interesse crescente para a remediação de locais contaminados com derramamentos de petróleo e alcatrão de hulha.<sup>50</sup> A

*Pseudomonas putida* é um dos microorganismos utilizados em tais casos, sendo capaz de utilizar naftaleno, inclusive, como única fonte de carbono.<sup>51</sup>

**Esquema 8. Via de conversão do naftaleno em piruvato e acetil coenzima A na bactéria *Pseudomonas putida* da cepa G7 (PpG7):** A via superior compreende as reações de conversão do naftaleno em salicilato e a via inferior de salicilato em piruvato e acetaldeído. A salicilato hidroxilase (NahG) catalisa a reação que conecta essas vias.<sup>4849</sup>

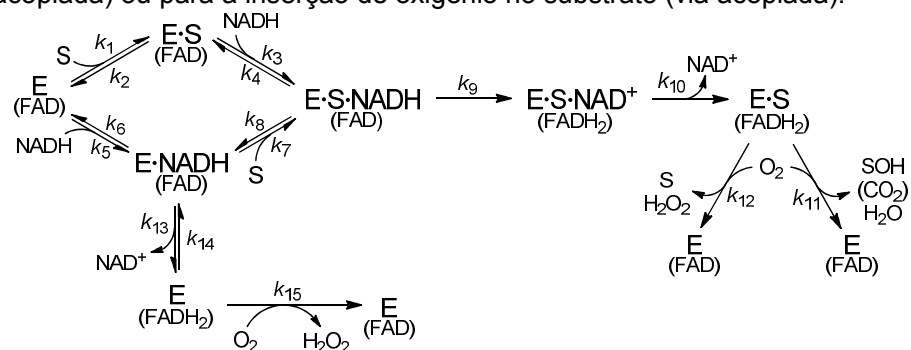


Fonte: o autor.

A salicilato hidroxilase (NahG) é uma monooxigenase flavodependente, que apresenta 421 resíduos de aminoácidos e uma massamolecular de 45 kDa.<sup>52</sup> Ela conecta as vias superior e inferior, catalisando a conversão de ácido salicílico em catecol em uma reação de descarboxilação oxidativa que envolve o consumo de quantidades equimolares de NADH e O<sub>2</sub>.<sup>53,54</sup> Ela é capaz de catalisar a reação de análogos substituídos do salicilato, inclusive do 1-hidroxi-2-naftoato,<sup>54</sup> salicilaldeído<sup>55</sup> e *orto*-halofenóis.<sup>56</sup>

Estudos cinéticos com salicilato hidroxilase de *P. cepacia* são consistentes com um esquema reacional do tipo *ping-pong*. A enzima liga salicilato e NADH de modo randômico, formando um complexo ternário que após redução do FAD e liberação do  $\text{NAD}^+$ , liga  $\text{O}_2$  com a formação de água,  $\text{CO}_2$  e catecol após a descarboxilação oxidativa; via culminando em  $k_{11}$  no Esquema 9. A formação de peróxido de hidrogênio pode ser observada quando o substrato não-natural é utilizado, por exemplo, quando benzoato é utilizado como substrato, a via de oxidação do FAD, quase que exclusivamente, leva a formação de peróxido de hidrogênio através davia que culmina em  $k_{12}$  no Esquema 9.<sup>57</sup>

**Esquema 9. Caminhos reacionais relacionados a atividade de NahG:** Substrato e NADH ligam-se randomicamente a enzima, que após ser reduzida pode desproporcionar para  $\text{H}_2\text{O}_2$  (via desacoplada) ou para a inserção de oxigênio no substrato (via acoplada).<sup>57</sup>



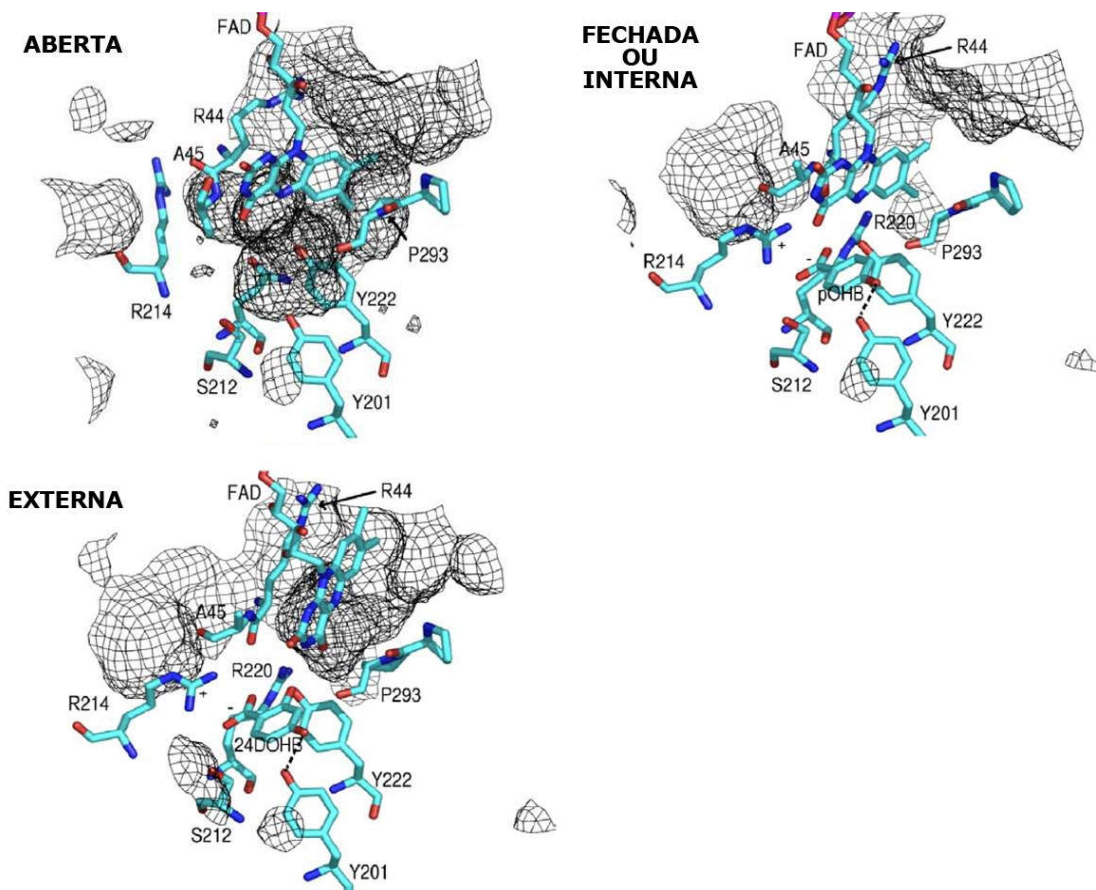
Fonte: Wang e Tu, 1984<sup>57</sup>.

Eventos dinâmicos, tanto na ligação dos cofatores e do substrato, são propostos para a atividade de diversas monooxigenases flavodependentes,<sup>58</sup> incluindo NahG. Estas enzimas sofrem dinâmica proteica e da flavina durante a catálise.

Existe uma conformação *aberta*, que permite o acesso do substrato e do produto para o solvente e uma conformação *fechada* ou *interna* para a reação com dioxigênio e para a hidroxilação do substrato ocorrer. A conformação *fechada* previne a desestabilização da espécie C4a-hidroperoxiflavina. Finalmente, existe uma conformação *externa*, obtida pelo movimento da porção isoaloxazina do FAD em direção ao solvente, expondo-a para redução pelo NADH. Essas conformações foram identificadas por cristalografia de raios-x para a enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilase (PHBH), EC 1.14.13.64 (Figura 3), que apresenta um grau de

similaridade de apenas 28% como a estrutura primária de NahG, mas uma elevada semelhança estrutural (*vide* p. 33).

**Figura 3. Conformações importantes na catálise por PHBH:** Forma *aberta* sem substrato ligado (PDB ID 1K0L); forma *fechada* ou *interna* com *p*-hidroxibenzoato ligado (PDB ID 1PBE); forma *externa* com 2,4-dihidroxibenzoato ligado (PDB ID 1DOD). A superfície mostrada em malha preta ilustra a porção do sítio ativo de PHBH acessível ao solvente.<sup>58</sup>



Fonte: Ballou *et al.*, 2005.<sup>58</sup>

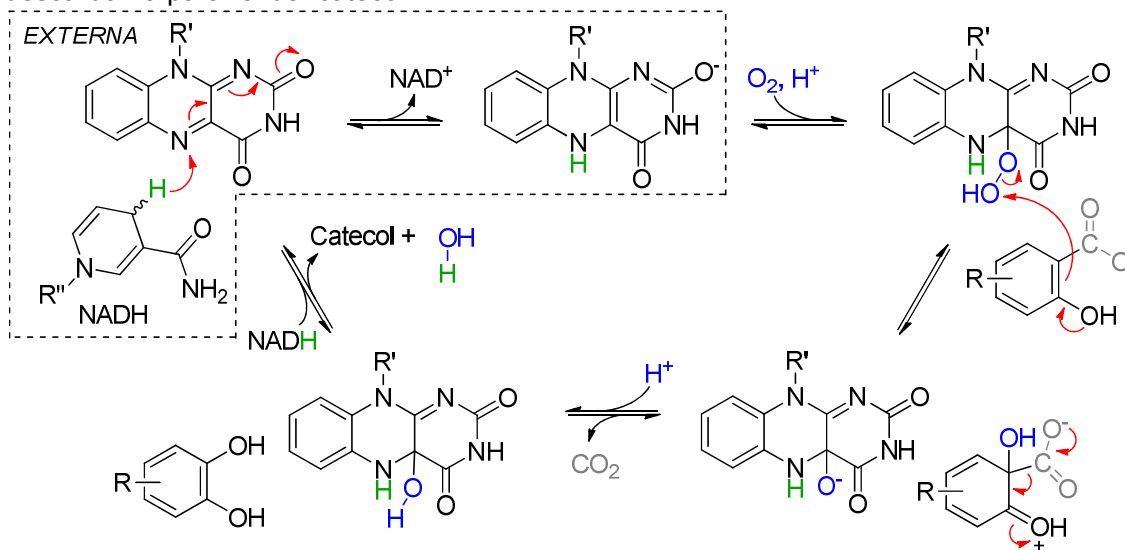
#### 1.4 Justificativa do trabalho

Como observado anteriormente, a inserção seletiva de oxigênio é uma reação de importância industrial, que demanda altas quantidades de energia e requer grandes investimentos econômicos, visto que os métodos tradicionais requerem condições extremas de temperatura e pressão.<sup>3, 5</sup> Desse modo, a necessidade em encontrar métodos mais baratos e mais ambientalmente corretos é atualmente uma busca importante em biotecnologia. Nesse ponto, as enzimas da família de oxigenases se apresentam como uma alternativa interessante para esta problemática, pois são capazes de realizar suas reações de forma rápida em condições brandas de temperatura e pressão. No esforço para implementar tais enzimas em processos tecnológicos, o conhecimento de seu mecanismo de ação é uma questão fundamental, pois permite prever a influência das condições do meio sobre as reações, os produtos esperados das transformações químicas e possíveis modificações ao meio e as próprias enzimas de modo a otimizar sua estabilidade e atividade catalítica.

Como descrito nesta introdução, o foco deste trabalho está na compreensão do mecanismo de catálise da enzima salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* cepa G7 (*PpG7*), uma monooxigenase flavodependente presente na via de degradação do naftaleno, realizando a conversão de salicilato em catecol ao custo de NADH. Visto que poucas evidências experimentais foram coletadas com relação ao mecanismo de ação da enzima NahG, este trabalho visa ampliar o conhecimento sobre suas características dinâmicas e cinéticas. A hipótese deste trabalho parte de observações para outras enzimas da mesma família, descritas anteriormente nesta introdução, em que a dinâmica da ligação do FAD depende de uma alça móvel e o mecanismo de reação pode ser dividido em duas partes (Esquema 10). Na primeira parte, o FAD ligado à enzima é reduzido por NADH envolvendo mudanças conformacionais, que podem ser inferidas por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e fluorimetria. Seguindo a redução do grupo isoaloxazina do FAD, este reage com dioxigênio para formar um intermediário C4a-hidroperoxiflavina altamente reativo. Em um mecanismo, que pensamos passar por Substituição Eletrofílica Aromática ( $S_{EAr}$ ), o oxigênio é inserido no anel aromático do salicilato e o intermediário formado sofre descarboxilação para render catecol. Nesse sentido, não só é importante determinar quais resíduos do sítio catalítico estão envolvidos na

catálise, como é crucial entender a demanda eletrônica durante a reação. Nessa parte, é fundamental a utilização de técnicas cinéticas amparadas por conceitos modernos da físico-química orgânica e ferramentas de biologia molecular, como a mutagênese sítio dirigida.

**Esquema 10. Mecanismo de catálise proposto para NahG:** A redução do FAD ocorre na conformação externa, provavelmente, com o substrato ligado. Após a formação da C4a-hidroperoxiflavina, ocorre a oxigenação eletrofílica do salicilato e o intermediário formado descarboxila para render catecol.



Fonte: o autor.

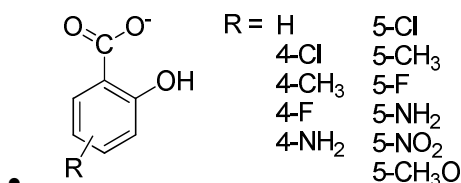
## 2 OBJETIVOS

O *objetivo geral* deste trabalho é a caracterização da enzima salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* cepa G7 em relação a sua dinâmica proteica e mecanismo de catálise. De modo a alcançar esse objetivo destacam-se os seguintes *objetivos específicos*:

- A expressão e purificação da enzima NahG nativa e mutantes H110N e H322Y. A enzima nativa será utilizada nos estudos de dinâmica proteica, termodinâmicos e cinéticos, enquanto as mutantes serão utilizadas somente nos estudos cinéticos;
- Avaliar a dinâmica estrutural da NahG nativa usando espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS);
- Determinar as constantes de ligação de FAD e ácido salicílico (AS) na NahG nativa utilizando titulação fluorimétrica;
- Por meio de espectroscopia UV-Vis, avaliar o efeito da concentração dos cofatores FAD e NADH na velocidade da reação catalisada por NahG nativa na presença dos substratos ácido salicílico e dioxigênio;
- Determinar o efeito da concentração dos substratos ácido salicílico e derivados substituídos (Figura 4), bem como de dioxigênio na velocidade da reação catalisada por NahG nativa, por meio de espectroscopia UV-Vis ou Fluorimetria;

**Figura 4. Substratos avaliados neste trabalho:** Salicilatos substituídos nas posições 4 e 5 com grupos eletrônicos ativadores e desativadores.

### Salicilatos



- Fonte: o autor.

- Estudar a influência do pH na atividade enzimática na presença dos cofatores e substratos por meio de espectroscopia UV-Vis. Esses estudos serão conduzidos com as enzimas nativa e mutantes;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

No preparo das soluções tampão e dos substratos foram utilizados reagentes de qualidade P.A. adquiridos comercialmente das empresas *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Acros*, *Vetec* e *Synth*. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade superior a 18,2 MΩ.cm a 25 °C. As soluções de NADH e FAD foram preparadas em água deionizada e estocadas a -20 °C para minimizar sua oxidação pelo O<sub>2</sub> atmosférico.

#### 3.2 Purificação e caracterização da NahG nativa e mutantes

As bactérias BL21 (DE3) *codon plus* contendo os plasmídeos para expressão dos genes da 6xHis-NahG nativa ou de seus mutantes H110N, H226A e H322Y da cepa bacteriana *Pseudomonas putida* G7 foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Estrutural BIOEST (Prof. Ronaldo Nagem) do ICB/UFMG, Belo Horizonte/MG. Basicamente, o plasmídeo para a NahG nativa foi construído por tecnologia DNA recombinante utilizando um vetor pET28a-TEV, que possui uma sequência codificadora para uma cauda de 6xHis<sub>N</sub>-terminal anterior ao sítio de clivagem para protease TEV. Os plasmídeos para os mutantes foram obtidos a partir do plasmídeo nativo utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida *QuikChange*<sup>®</sup> *Lightning* (Stratagene) ou *Q5*<sup>®</sup> (NewEngland BioLabs) e seus protocolos padrão, tendo sido os plasmídeos sequenciados para verificar a presença das mutações.<sup>59</sup> A sequência de aminoácidos para a NahG nativa com uma cauda 6xHis e um sítio de clivagem TEV está apresentada na Figura 5. Após clivagem com a protease TEV a proteína deve apresentar somente dois resíduos de aminoácidos além da sequência nativa: glicina, proveniente do sítio da protease, e histidina, proveniente do sítio da enzima de restrição NdeI do processo de clonagem. A Tabela 1 apresenta os valores de massa molar, antes e após a clivagem, para a NahG nativa e mutantes H110N e H322Y, bem como o valor de absorvidade molar calculado pelo servidor *PROTEIN CALCULATOR v3.4*. A NahG H226A não pode ser obtida, permanecendo em uma forma insolúvel durante a expressão (dados não mostrados).

**Figura 5. Sequência de aminoácidos para a NahG nativa com uma cauda 6xHis e umsítio de clivagem TEV.** Após a clivagem com a protease TEV a porção em negrito é removida, permanecendo apenas dois resíduos de aminoácidos, indicados por GH na porção NH<sub>2</sub>-terminal da proteína nativa, que inicia no resíduo de metionina (M) sublinhado.

<b>MGHHHHHEN</b> <b>LYFQ</b> <u>GH</u> MKNN KLGLRIGIVG GGISGVALAL ELCRYSHIQV QLFEAAPAFG	60
EVGAGVSFGP NAVRAIVGLG LGEAYLQVAD RTSEPWEDVW FEWRRGSDAS YLGATIAPGV	120
GQSSVHRADF IDALVTHLPE GIAQFGKRAT QVEQQGGEVQ VLFTDGTEYR CDLLIGADGI	180
KSALRSHVLE GQGLAPQVPR FSGTCAYRGM VDSLHLREAY RAHGIDEHLV DVPQMYLGLD	240
GHILTFPVRN GGIINVVAFI SDRSEPKPTW PADAPWVREA SQREMLDAFA GWGDAARALL	300
ECIPAPTLWA LHDLAELPGY VHGRVVLIGD AAHAMPLPHQG AGAGQGLEDA YFLARLLGDT	360
QADAGNLAEL LEAYDDLRRP RACRVQQTSW ETGELYELRD PVVGANEQLL GENLATRFDW	420
LWNHDLDTDL AEARARLGWE HGGGGALRQG	450

Fonte: Costa, 2014.<sup>60</sup>

**Tabela1. Massa molar (MM), antes e após a clivagem por TEV, e absortividade molar ( $\epsilon$ ) em 280 nm para a NahG nativa e mutantes H110N e H322Y.** Esses valores foram obtidos pelo servidor *PROTEIN CALCULATOR* v3.4, disponível em <http://protcalc.sourceforge.net/>.

NahG	MM antes da clivagem (Da)	MM após a clivagem (Da)	$\epsilon_{280nm}$ após clivagem ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
Nativa	48.964	47.158	76.670
H110N	48.941	47.135	76.670
H322Y	48.990	47.184	77.950

Fonte: o autor.

### 3.2.1 Expressão da 6xHis-NahG nativa e mutantes

Preparou-se um pré-inóculo das bactérias em meio LB líquido(Luria-Bertani: 0,5% extrato de levedura, 1% peptona,1% NaCl e pH 7,0) contendo canamicinae cloranfenicol para concentrações de 35 e 50  $\mu g mL^{-1}$ , respectivamente.O pré-inóculo foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, preparou-se o inóculo na proporção 1 parte de pré-inóculo para 50 partes de meio LB líquido com 35  $\mu g mL^{-1}$  canamicina e 50  $\mu g mL^{-1}$  cloranfenicol. As células do inóculo cresceram a 37°C sob agitação de 200rpm em erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultura; um total de 6 litros de meio de cultura foram utilizados. O crescimento bacteriano foi monitorado em um espectrofotômetro até a absorvância alcançar 0,6 a 0,8 em 600 nm. Alcançada essa leitura, o inóculo foi incubado por mais 20 minutos a 18°C sob agitação de 200rpm. Em seguida, foi adicionado o indutor IPTG (isopropil-

$\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 0,5 mM. A indução foi feita por 16 horas a 21°C sob rotação de 200 rpm. Então, o meio de cultura foi centrifugado a 5.000 g por 5 min a 4°C para render aproximadamente 3g de bactéria por litro de meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e a porção sólida foi utilizada imediatamente na lise e purificação proteica.

### 3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular

As células obtidas da centrifugação foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% m/v sacarose, 1% v/v Tween 20 e 1% v/v glicerol) na proporção de 3 partes de tampão de lise em relação a cada 100 partes de meio de cultura centrifugado. As células foram rompidas com um emulsificador EmulsiFlex-C3 (Avestin®) para originar um homogenato celular que foi centrifugado a 10.000 g por 60 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o corpo de fundo descartado.

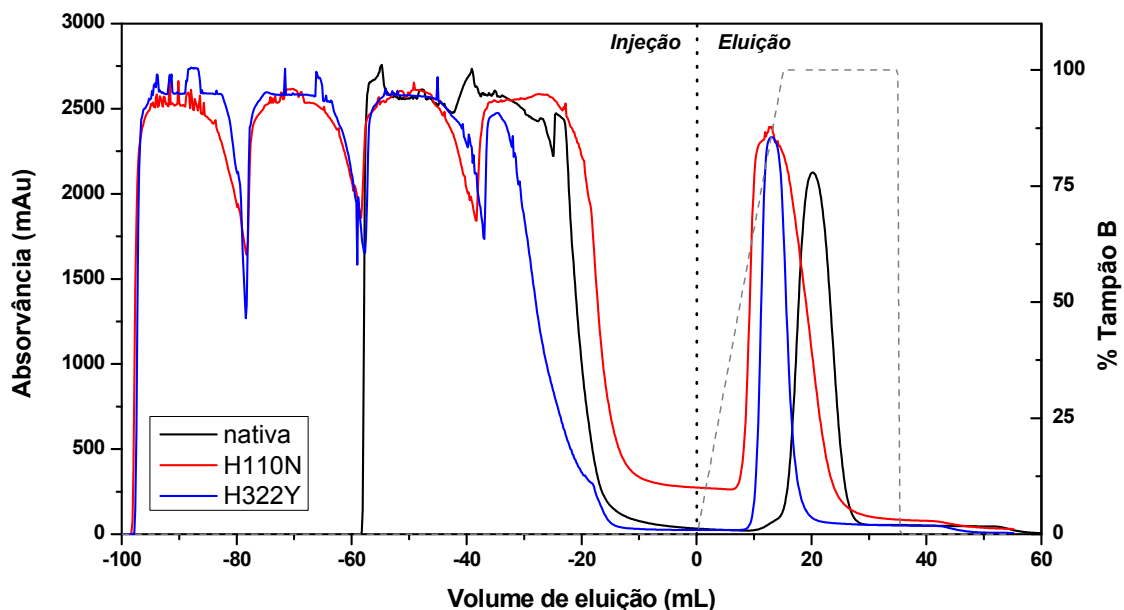
As purificações proteicas foram feitas utilizando um cromatógrafo líquido rápido de proteínas (FPLC) da ÄKTAprius plus (GE Healthcare) equipado com detectores para absorvância a 280 nm, pH e condutividade. Uma série de colunas de afinidade e de exclusão molecular foram utilizadas.

A coluna de afinidade HisTrap™ HP 5 mL (GE Healthcare) foi pré-equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl e 30 mM imidazol). Em seguida o sobrenadante obtido da lise foi injetado na coluna, que foi eluída com tampão A até a absorvância em 280 nm chegar a um patamar próximo a zero. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl e 500 mM imidazol) a 5 mL min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas na Figura 6 mostram os perfis de purificação por cromatografia por afinidade e as bandas de eluição para NahG.

As frações obtidas da cromatografia de afinidade, que continham as proteínas recombinantes (*vide* Figura 6), foram reunidas e imediatamente eluídas em tampão C (50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl) utilizando uma coluna de dessalinização HiPrep™ 26/10 (GE Healthcare). As frações obtidas foram reunidas e submetidas a clivagem com a protease TEV para remoção da cauda 6xHis.

**Figura 6. Cromatograma das purificações por afinidade da NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y) utilizando a coluna HisTrap™ HP 5 mL (GE Healthcare).** As proteínas

foram eluídas com um gradiente linear de 30 a 500 mM de imidazol em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 500 mM NaCl.



Fonte: o autor.

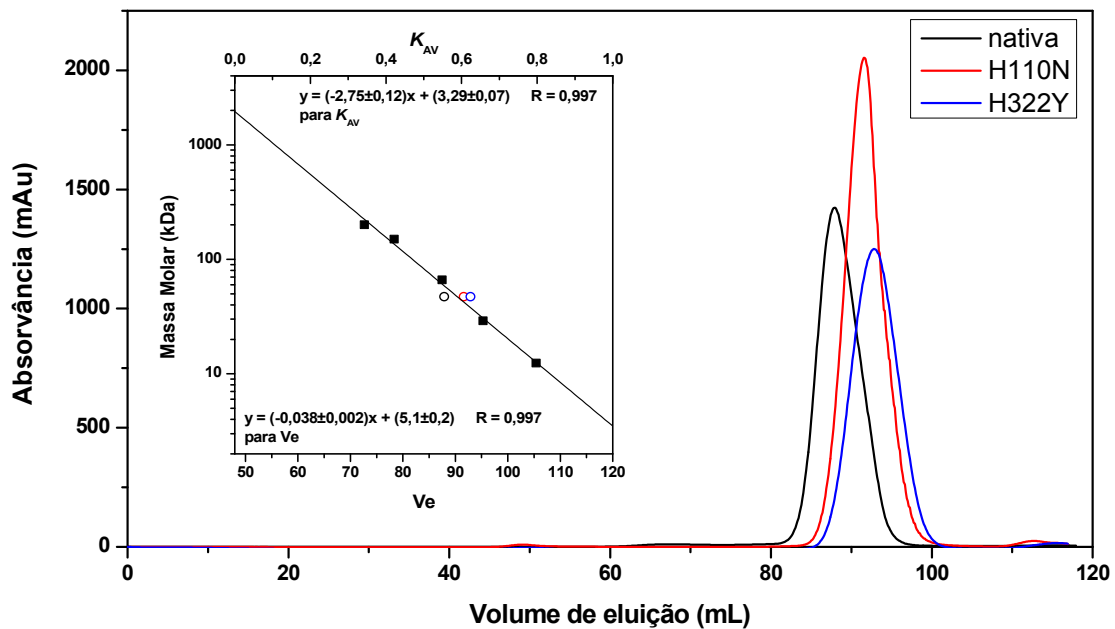
### 3.2.3 Clivagem com a protease TEV para remoção da cauda 6xHis

A clivagem das caudas de histidinas da 6xHis-NahG nativa e mutantes foi realizada em 4 °C por 16 h, em tampão contendo 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0 e uma proporção de TEV:6xHis-NahG de 1:5 em mg de proteína. A TEV foi produzida seguindo protocolo padrão do Laboratório BIOEST contendo uma cauda 6xHis, que não pode ser autoclivada.

A solução proveniente da clivagem foi submetida a uma nova etapa de purificação por cromatografia de afinidade, levando à remoção da TEV e da porção clivada da 6xHis-NahG. A NahG obtida da eluição foi submetida a um novo processo de dessanilização, concentrada utilizando um concentrador para centrifuga Vivaspin (faixa de corte de peso molecular de 10.000, 6 e 20 ml de capacidade, GE Healthcare) para um volume de 5 mL. Por fim, a proteína foi eluída a 1 mL min<sup>-1</sup> com tampão C (50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl) em uma coluna de exclusão molecular Hiload™ 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Os cromatogramas na Figura 7 mostram os perfis de purificação por cromatografia de exclusão molecular e atribuições das bandas de eluição para a NahG nativa e mutantes após a clivagem. Essas proteínas eluem com

uma massa molar em torno de 47 kDa conforme comparativo com o perfil cromatográfico (log MM vs  $V_e$  ou  $K_{AV}$ ; onde  $V_e$  é o volume de eluição e  $K_{AV}$  é o coeficiente de partição, inserto da Figura 7) de padrões proteicos de massa molecular crescente e conhecida. As frações contendo a proteína foram novamente concentradas para um volume de 1 mL na concentração de 30 mg/mL. Por fim, adicionou-se glicerol suficiente para obter uma solução 15 % (v/v) em glicerol, que foi dividida em alíquotas de 200  $\mu$ L e mantidas em freezer -80 °C para uso posterior.

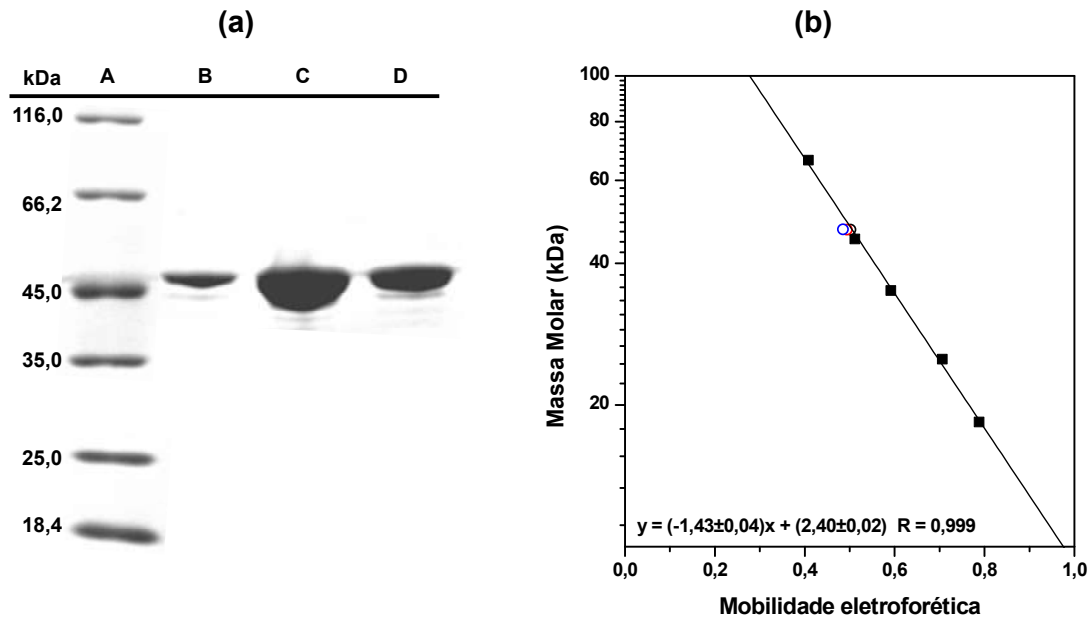
**Figura 7. Cromatograma das purificações por exclusão molecular da NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y) utilizando a coluna HiloLoad™ 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Inseto: Curva de calibração de log MM versus  $V_e$  ou  $K_{AV}$ .** As proteínas NahG foram eluídas isocraticamente com tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 500 mM NaCl.  $K_{AV}$  refere ao coeficiente de partição dado pela fórmula  $[(V_e - V_o)/(V_c - V_o)]$ , onde  $V_e$  corresponde ao volume de eluição da proteína,  $V_c$  e  $V_o$  são, respectivamente, o volume total (120 mL) e o volume vazio (47,9 mL) da coluna. Os padrões de massa molecular foram  $\beta$ -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,4 kDa). No inserto os pontos em círculos vazado preto, vermelho e azul indicam, respectivamente, os  $V_e$  para NahG nativa, H110N e H322Y com massas molares de 47 kDa.



Fonte: o autor; os dados no inserto (quadrados em preto) são padrões para a coluna e foram cedidos pelo laboratório BIOEST.

As identidades e purzas da NahG nativa e mutantes foram avaliadas por eletroforese em gel (SDS-Gel) de acrilamida contendo 12 % de bis-acrilamida a 100 V, mostrando uma banda majoritária próxima de 47 kDa (Figura 8) conforme comparativo com o perfil eletroforético (log MM vs mobilidade eletroforética) de padrões proteicos de massa molecular crescente e conhecida. A concentração foi determinada por espectroscopia UV-Vis em 280 nm (Figura 9) utilizando os coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) apresentados na Tabela 1. Os valores da razão da absorvância em 260/280 foram inferiores a 0,65.

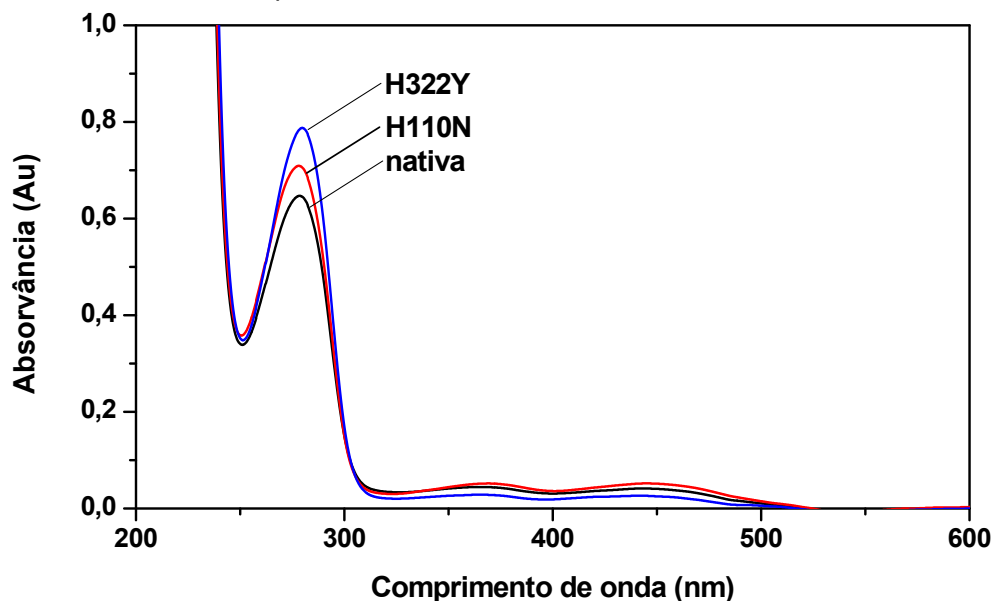
**Figura 8. (a) Eletroforese SDS-Gel em acrilamida contendo 12 % de bis-acrilamida a 100 V após revelação com *Comassie Blue*: Canaleta: A. padrão contendo proteínas de massa conhecida<sup>a</sup>, conforme indicado; B. NahG nativa; C. NahG H110N; D. NahG H322Y; (b) Perfil eletroforético de padrões proteicos de massa molar conhecida (Canaleta A): os pontos em círculos vazados em preto, vermelho e azul indicam, respectivamente, as mobilidades eletroforéticas para NahG nativa, H110N e H322Y com massas molares de 47 kDa.**



<sup>a</sup>Unstained Protein Molecular Weight Marker – Thermo Scientific Pierce™

Fonte: o autor.

**Figura 9. Espectros de UV-Vis para as proteínas NahG nativa e mutantes (H110N e H322Y).** As medidas foram realizadas em água, apresentam um máximo de absorção em 280 nm e uma razão 260/280 inferior a 0,65. Concentração: 400, 490 e 430 µg/mL para NahG nativa, H110N e H322Y, respectivamente.



Fonte: o autor.

### 3.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small-Angle X-ray Scattering*) foram medidas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas/SP, na linha de luz SAXS2 utilizando um detector MAR-165 (Tamanho de 165mm e diâmetro de 2048 x 2048 pixels). As amostras consistiram de soluções tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl contendo NahG (29,8-233 µM) na ausência e presença de cofator FAD (91,0-520 µM). As amostras foram centrifugadas (13.000 g por 10 minutos a 4 °C) antes da coleta de dados. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) foi de 1,55 Å e a distância amostra-detector de 964,41 mm durante a coleta. O intervalo do módulo do vetor de espalhamento foi de  $0,0069 < q < 0,2692 \text{ \AA}^{-1}$ , onde  $q = 4\pi \frac{\sin \theta}{\lambda}$  (sendo  $2\theta$  o ângulo de espalhamento). As curvas de espalhamento das soluções tampão e das amostras de proteínas foram coletadas em etapas consecutivas com tempos de exposição de 300 e 600 segundos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, bem como para avaliar a estabilidade do feixe. O porta-amostra tinha 1,0 mm de espessura e janelas de mica à temperatura constante de 25 °C.

A integração de dados, normalização da intensidade do feixe transmitido e atenuação da amostra, bem como subtração do espalhamento do tampão, foram feitas com o programa Fit2D.<sup>61</sup> A calibração absoluta dos dados de espalhamento foi realizada utilizando água como padrão secundário.<sup>62</sup> As análises dos dados de SAXS foram realizadas com o pacote ATSAS 2.5.2.<sup>63</sup> Os valores para o raio de giração ( $R_g$ ) e a intensidade de espalhamento a ângulo zero ( $I(0)$ ) foram obtidos tanto a partir da aproximação de Guinier  $I(q) = I(0)\exp(-q^2R_g^2/3)$ , válida para  $qR_g < 1,3$ , quanto pelo método de transformada de Fourier indireta implementado no programa GNOM. O último também foi utilizado para calcular a função de distribuição de pares de distância,  $p(r)$ , a partir da curva de espalhamento. O estado conformacional da proteína em solução foi avaliado pelo gráfico de Kratky ( $q^2I(q) \times q$ ) obtido diretamente a partir da curva de espalhamento.<sup>64</sup>

A partir das curvas de espalhamento foram gerados vinte modelos de baixa resolução do tipo DAM (Modelo de átomos fictícios -*Dummy Atom Model*) utilizando o pacote DAMMIN,<sup>65</sup> tendo a média dos modelos gerados foi realizada com o programa DAMVER.<sup>66</sup> Esse modelo médio foi comparado com os dados de estrutura cristalográfica usando o programa SUPCOM.<sup>67</sup>

### **3.4 Determinação das constantes de ligação por fluorimetria**

As medidas de fluorescência foram realizadas 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 experimentos foram realizados sob agitação magnética e termostatização para  $25,0 \pm 0,1$  °C providas na própria cela Peltier do equipamento. Cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 mL e quatro faces polidas foram utilizadas. O pH das soluções utilizadas nos procedimentos foi determinado com um potenciômetro digital *Hanna Instruments pH 200*, equipado com um eletrodo de vidro de junção líquida com bulbo de vidro, calibrado previamente com soluções padrão nos valores de pH 4,00, 7,00 e 10,00.

Soluções 1,0  $\mu\text{M}$  de NahG em pH 8,0 com força iônica 0,2 (55,6 mM HEPES, 181 mM NaCl e 1,11 mM EDTA) foram tituladas com alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de FAD (0-2,5  $\mu\text{M}$ ) ou AS (0-4  $\mu\text{M}$ ) na presença de 1,5  $\mu\text{M}$  de FAD. Os dados

espectrofluorimétricos foram corrigidos, onde indicado, para a diluição que foi sempre inferior a 10 % do volume total (2 mL) considerando que,  $F_{\text{corr}} = F_{\text{uncorr}} \cdot (V_o + V_t) / V_o$ , onde  $F_{\text{uncorr}}$  e  $F_{\text{corr}}$  são na ordem as fluorescências não-corrigidas e corrigida. A concentração, após a diluição, foi corrigida considerando que  $C_c = V_o \cdot C_o / (V_o + V_t)$ , onde  $C_o$  e  $C_c$  são as concentrações inicial e após a diluição. O  $V_o$  e  $V_t$  são os volumes iniciais e total das alíquotas adicionadas. Os parâmetros de configuração do equipamento foram um tempo de integração de 0,1s e uma tensão da fotomultiplicadora de 600 V. Os tamanhos das fendas de excitação e emissão são apresentados juntamente com os espectros.

### 3.5 Experimentos cinéticos

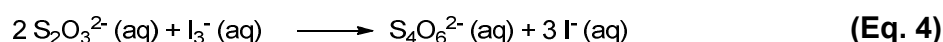
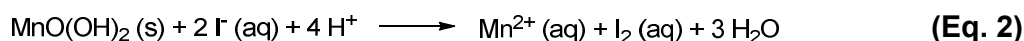
As medidas cinéticas por espectrofotometria UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro *Varian Cary 50*, acoplado a um microcomputador contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados cinéticos *Cary WinUV 3.00(183)*. O espectrofotômetrofoiequipado com um sistema de termostatização para cubeta acoplado a um banho termostático da *PolyScience* com precisão de  $\pm 0,1$  °C. O pH das soluções utilizadas nos procedimentos cinéticos foi determinado conforme realizado nos experimentos de fluorimetria. Cubetas de quartzo com capacidade de 1,4 mL (1 mL de solução) foram utilizadas.

A atividade enzimática foi avaliada na presença de concentrações crescentes de substratos e cofatores (NADH e FAD) em diferentes valores de pH a  $25,0 \pm 0,1$  °C. Estes valores estão especificados na seção de Resultados e Discussão. As reações foram iniciadas pela adição de enzima utilizando um aparato *cuvette mixer* (Sigma-Aldrich). O pH foi mantido com 50 mM dos seguintes tampões: Bis-Tris (pH 5,8 - 7,2), Hepes (pH 6,8 - 8,2) ou Ches (pH 8,6 - 10,0), tendo sido adicionado 1 mM de EDTA e a força iônica ajustada com NaCl para 0,20. As reações foram acompanhadas pelo consumo de NADH, monitorado pela sua absorção em 340 nm, e para cada concentração de substrato em excesso foram coletados dados de absorvância em função do tempo.

Os estudos cinéticos em diferentes concentrações de dioxigênio foram realizados sob atmosfera controlada com argônio. Soluções de concentração conhecida de dioxigênio foram preparadas pela diluição de uma solução saturada

com uma solução isenta de dióxigênio. As soluções isentas de dióxigênio foram preparadas a partir de soluções aquosas fervidas e resfriadas sob vácuo.

A concentração de dióxigênio na solução saturada foi determinada pelo método de Winkler.<sup>68</sup> Basicamente, em 2mL de amostra foi adicionado 10µL de MnSO<sub>4</sub> 2,6 mol L<sup>-1</sup> e 10µL de KI 0,96 M em NaOH 6,6 M. Após homogeneizar a solução, a amostra foi deixada em repouso por 5 minutos, quando se adicionou várias gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado para dissolver o precipitado formado. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi titulada com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,01 M até a coloração amarelada de iodo desaparecer. Posteriormente, se adicionou 100 µL de indicador (solução saturada de amido) e a titulação foi continuada até o desaparecimento da coloração azul. O cálculo da concentração de O<sub>2</sub> foi realizado considerando as seguintes relações entre o I<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>:



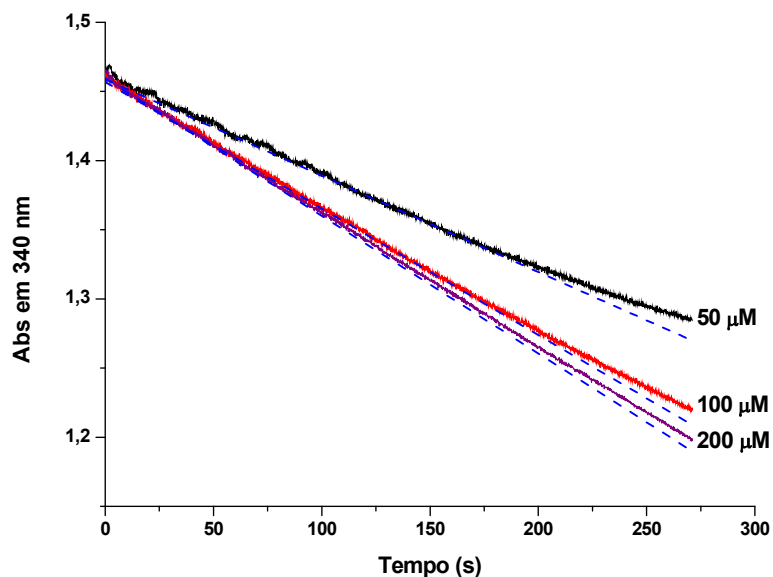
$$\frac{(\text{Volume gasto de tiosulfato de sódio em mL } 0,01\text{M}/4)}{\text{Volume de alíquota}} = [\text{O}_2] \text{ mM} \quad (\text{Eq. 5})$$

As medidas cinéticas por espectrofluorimetria foram realizadas quando os substratos (ácidos 5-aminosalicílico e 5-metoxisalicílico) absorviam em 340 nm. Nesses casos, as reações foram seguidas pela emissão do NADH em 472 nm a 25,0 ± 0,1°C, conforme indicado anteriormente para a determinação das constantes de ligação.

O método de velocidades iniciais foi aplicado na coleta de dados, de modo que apenas uma pequena quantidade de produto havia sido formada. A velocidade foi calculada considerando que  $v = \frac{\alpha}{b \epsilon_{\text{NADH}}}$  para os estudos por espectroscopia UV-Vis e  $v = \frac{\alpha}{b K_{\text{NADH}}}$  para os estudos por espectrofluorimetria, onde  $\alpha$  corresponde à inclinação da curva de absorvância em função do tempo, conforme exemplificado pela Figura 10,  $b$  o caminho ótico que foi de 1 cm em todos os experimentos,  $\epsilon_{\text{NADH}}$  é a absorvidade molar do NADH (6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em 340 nm<sup>69</sup>) e  $K_{\text{NADH}}$  é a equação da emissão, que corresponde a resposta da fluorescência

do NADH como função da concentração sob os mesmos parâmetros do equipamento utilizado nas medidas cinéticas. Conforme observado na Figura 11, a intensidade de fluorescência como função da concentração de NADH apresenta linearidade até 100  $\mu\text{M}$ , que foi o limite para todos os experimentos cinéticos realizados com espectrofluorimetria.

**Figura 10. Curvas cinéticas da reação de conversão de ácido salicílico (concentração indicada no gráfico) em catecol.** As medidas foram realizadas por espectroscopia UV-Vis em 340 nm, pH 8,0 (tampão 50 mM HEPES e 1 mM EDTA), força iônica ajustada com NaCl para 0,20, mM FAD, 1 mM NADH e 0,064  $\mu\text{M}$  NahG. As linhas tracejadas correspondem a inclinação da curva de absorvância em função do tempo para o cálculo das velocidades iniciais.



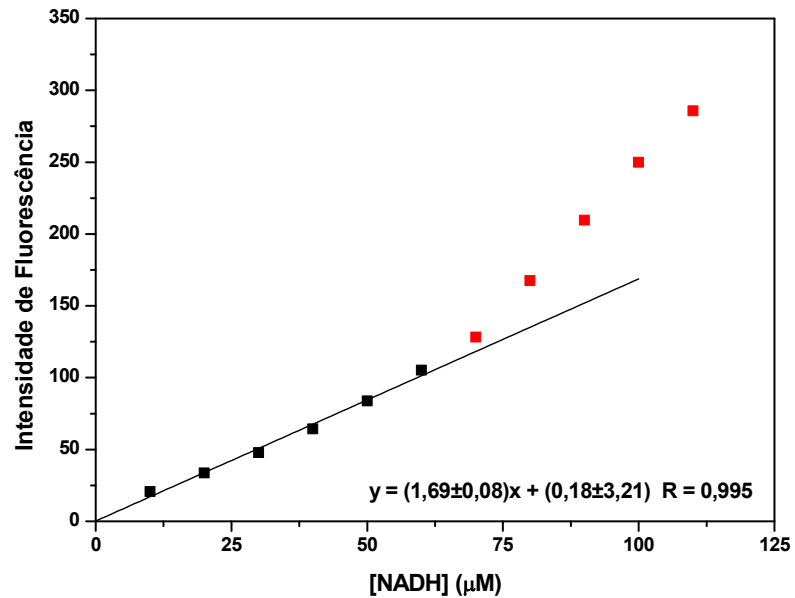
Fonte: o autor.

As velocidades iniciais foram plotadas em função da concentração do analito. Esse perfil cinético foi considerado no ajuste não-linear com a equação de Michaelis-Menten (Equação 6) para obter os valores das constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e de velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Nos casos em que a concentração mais elevada de substrato levou a diminuição da velocidade reacional, utilizou-se a Equação 7 que leva em consideração a constante de inibição  $K_i$ . O valor da constante catalítica ( $k_{cat}$ ) foi calculado a partir de  $V_{m\acute{a}x}$  considerando que  $k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/[E]$ , onde  $[E]$  é a concentração total de enzima.<sup>69</sup>

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M+[S]} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M+[S]+[S]^2/K_i} \quad (\text{Eq. 7})$$

**Figura 11.** Resposta da intensidade de fluorescência em 472 nm em função da concentração de NADH. As medidas foram realizadas em pH 8,0 (tampão 50 mM HEPES e 1 mM EDTA) e força iônica ajustada com NaCl para 0,20. O comprimento de onda de excitação foi 340 nm utilizando os seguintes parâmetros: fenda de excitação e emissão de 10 nm. A linha sólida corresponde à regressão linear dos dados, excluindo os pontos em vermelho, obtendo a equação apresentada no gráfico.



Fonte: o autor.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

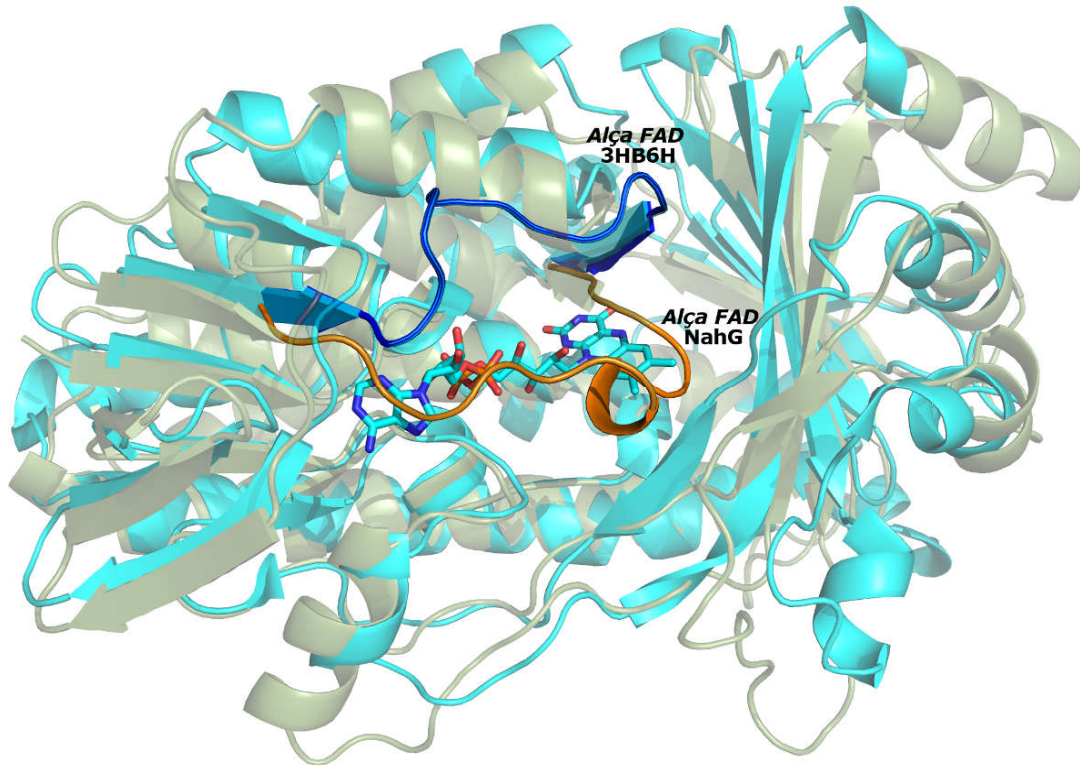
De modo geral, esta seção é dividida sob duas linhas principais: *i.* análise de dados estruturais relacionados a dinâmica proteica da NahG, em especial no que refere aos eventos relacionados à ligação do cofator FAD; *ii.* análise de dados cinéticos que permitiram obter informações sobre o mecanismo de catálise da NahG.

No âmbito dos estudos cinéticos foram realizados experimentos em diferentes valores de pH com o substrato salicilato, de modo a obter informações sobre grupos acido-básicos envolvidos diretamente na catálise enzimática. Esse resultado foi importante para uma análise de dados cinéticos obtidos com as enzimas mutantes H110N e H322Y, mostrando a importância dos resíduos de histidina mutados na enzima nativa. Na enzima nativa, salicilatos substituídos também foram utilizados para avaliar a demanda eletrônica no estado de transição da reação catalisada. Dos dados desses estudos são obtidas as conclusões mais importantes deste trabalho. Adicionalmente, se deve mencionar que, dados básicos sobre constantes de ligação e Michaelis-Menten foram obtidos com FAD, NADH e O<sub>2</sub>.

### 4.1 Dinâmica proteica da NahG: Estudos de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

A estrutura da apoenzima 6xHis-NahG foi recentemente resolvida por Costa e Nagem (2014),<sup>60</sup> sendo, até onde é de nosso conhecimento, a primeira estrutura de um membro da família de monooxigenase flavodependentessem apresentar o cofator FAD ligado. A sobreposição dessa estrutura com a estrutura tridimensional de 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) de *Rhodococcus jostii* RHA1 com FAD ligado e fosfatidilglicerol (PDB IB 4BJZ)<sup>70</sup> mostra uma alça móvel entre os resíduos 36 e 52 da NahG (Figura 12). Esta alça, dita *alça móvel de ligação do FAD* ou simplesmente *alça FAD*, alterna entre duas posições, a não-ligada a FAD (*vide* a NahG) e ligada a FAD (*vide* a 3HB6H). Convém mencionar que a 3HB6H e NahG apresentam somente 28% de identidade na sua estrutura primária, conforme uma análise com BLAST<sup>®</sup>,<sup>71</sup> mas uma elevada similaridade estrutural (RMSD = 1,763Å para 258 átomos) como observado na sobreposição apresentada na Figura 12.

**Figura 12. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando a dinâmica da alça de ligação do FAD (Alça FAD). A 3-hidroxi benzoato 6-hidroxilase (3HB6H) com PDB ID 4BJZ esta em cinza, ligada a FAD e com sua alça FAD (resíduos 34-50) mostrada em azul. A posição desta alça difere da 6xHis-NahG não-ligada a FAD, mostrada em verde com sua alça FAD(resíduos 36-52)em laranja.**



Fonte: o autor; a figura foi gerada a partir dos respectivos PDBs utilizando o programa Pymol 1.5.<sup>72</sup>

Nosso interesse nesta parte do trabalho foi voltado à dinâmica da alça FAD. A comparação entre os dados cristalográficos, com resolução por raios-X, das estruturas de 6xHis-NahG não-ligada e ligada ao FAD poderia demonstrar diversas nuances sobre a dinâmica da alça FAD da NahG, por exemplo, posição do FAD e de resíduos importantes, amplitude de movimentos proteicos, etc. Sem dúvida esta seria a escolha mais adequada de análise se a estrutura da 6xHis-NahG ligada ao FAD estivesse disponível. No entanto, como é bem sabido, a obtenção de um cristal para tal fim não é uma tarefa fácil, senão uma arte, embora muito mais facilitada atualmente.<sup>73</sup>

Tentativas foram feitas de cristalização da 6xHis-NahG na presença de 20 eq. FAD, 72 condições pelos métodos de gota-sentada e gota-suspensa, tendo sido as condições levemente variadas em relação as condições de cristalização da 6xHis-NahG não-ligada, *i.e.*, 1,0-1,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15,0-22,5% Glicerol, 0,1 M Tris pH 8,5. O resultado não foi produtivo, tendo sido obtido, invariavelmente, a formação de agregados amorfos e precipitação. Dessa forma, nossa atenção voltou-se aos estudos com espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), que embora não permitam a análise de dados em resolução suficiente para observação do movimento de cadeias laterais e outras moléculas ou íons, tem se mostrado uma ferramenta poderosa na análise estrutural de proteínas em solução. O SAXS fornece informações sobre o tamanho, forma e visualização tridimensional de proteínas ou complexos formados através de modelos de baixa resolução, sendo adequado para análise de diferenças conformacionais caso estas sejam de magnitude adequada em relação à resolução do experimento.<sup>74</sup>

Neste estudo, foram avaliadas soluções com concentrações de 29,8 a 233,0  $\mu\text{M}$  de 6xHis-NahG na ausência e na presença de FAD (91,0-520  $\mu\text{M}$ ) em 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl. Na Tabela 2 são apresentadas as medidas realizadas (NahG1 a NahG9) em diferentes concentrações de apo NahG na ausência e na presença de FAD. A proporção de FAD em relação à apo NahG foi pelo menos equivalente e um tempo de incubação de 1 minuto foi utilizado em cada medida na presença de FAD.

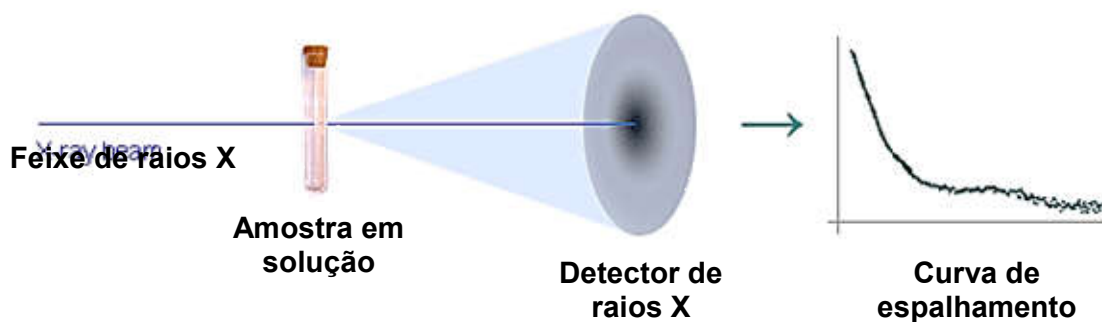
**Tabela 2. Proporções estequiométricas entre apo NahG e FAD utilizadas na obtenção das curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).** As denominações referem a cada medida utilizando as concentrações indicadas de NahG e FAD em 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 50 mM NaCl.

Denominação da medida	[apo NahG] ( $\mu\text{M}$ )	[FAD] ( $\mu\text{M}$ )	Razão [FAD]-[apo NahG]
NahG1	29,8	---	---
NahG2	91,6	---	---
NahG3		91,0	1,0
NahG4	201,4	---	---
NahG5		520,0	2,6
NahG6	296,8	---	---
NahG7		520,0	1,8
NahG8	233,0	---	---
NahG9		520,0	2,2

Fonte: o autor.

No SAXS, como pode ser observado na Figura 13, um feixe de luz incide na amostra de proteína e interage como os elétrons da amostra fazendo-os oscilarem na frequência da onda incidente. A radiação espalhada é coletada por um detector e transformada em uma curva de logaritmo da intensidade de espalhamento  $\log(I)$  em função do módulo do vetor de espalhamento  $s$ .

**Figura 13. Ilustração sobre o funcionamento básico do SAXS.** O feixe de raios X incidente sobre a amostra é espalhado e coletado em um detector, gerando uma curva de espalhamento.

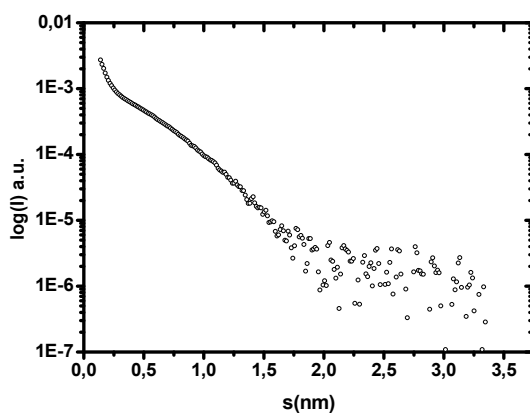


Fonte: modificado de <http://biosaxs.com/technique.html>

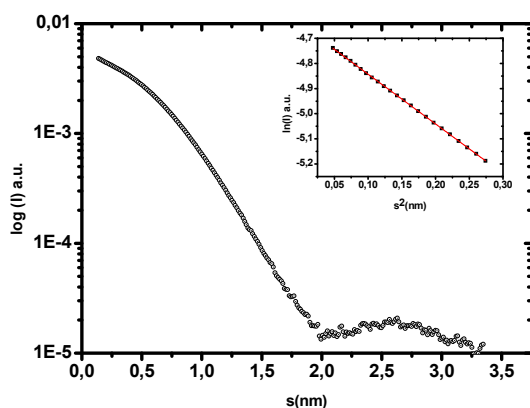
Na Figuras 14 são apresentadas as curvas de espalhamento para cada uma das medidas indicadas na Tabela 2.

**Figura 14. Curvas experimentais de espalhamento de raios-X em solução de apo NahG na ausência e presença de FAD.** Gráfico de Guinier e ajuste linear em vermelho são mostrados no inserto de cada gráfico. De acordo com a Tabela 2: **NahG1** - 29,8  $\mu$ M apo NahG; **NahG2** - 91,6  $\mu$ M apo NahG; **NahG3** - 91,6  $\mu$ M apo NahG + 91,0  $\mu$ M FAD; **NahG4** - 201,4  $\mu$ M apo NahG; **NahG5** 201,4  $\mu$ M apo NahG + 520,0  $\mu$ M FAD; **NahG6** - 296,8  $\mu$ M apo NahG; **NahG7** - 296,8  $\mu$ M apo NahG + 520,0  $\mu$ M FAD; **NahG8** - 233,0  $\mu$ M apo NahG; **NahG9** - 233,0  $\mu$ M apo NahG + 520,0  $\mu$ M FAD.

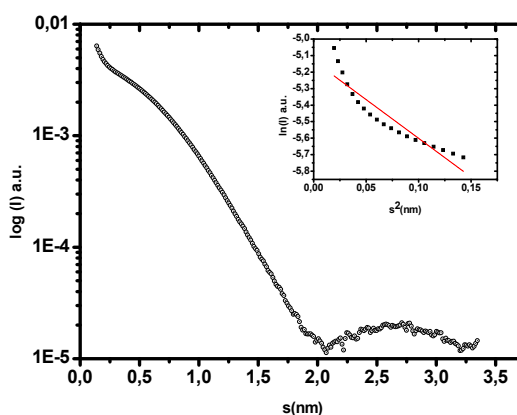
**NahG1**



**NahG2**

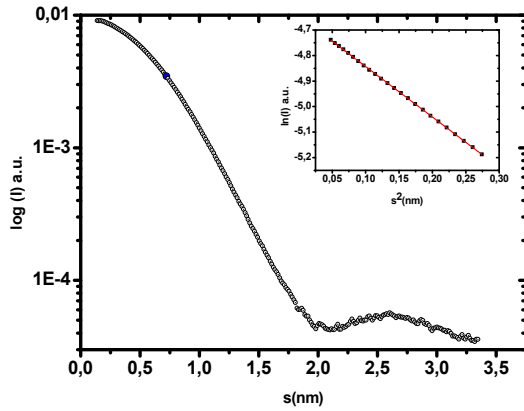


**NahG3**

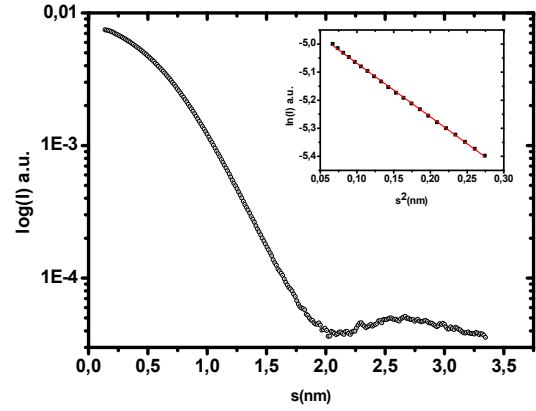


Continuação da Figura 14...

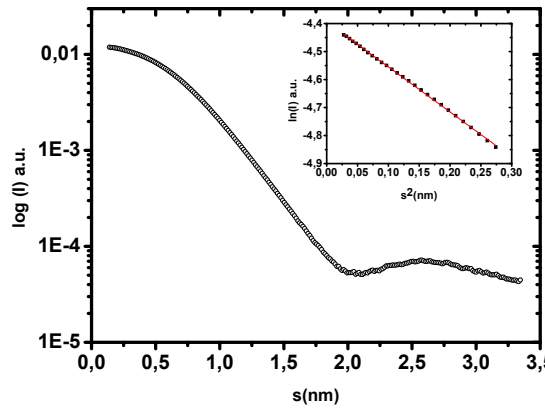
NahG4



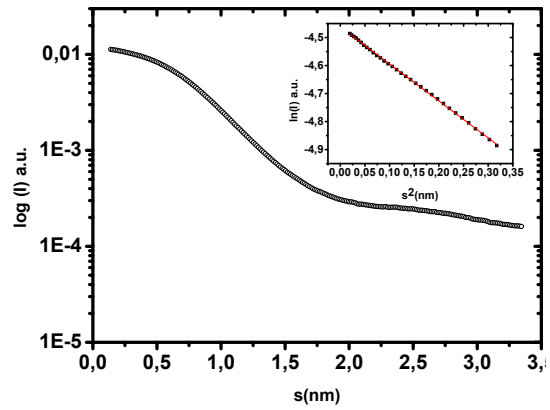
NahG5



NahG6

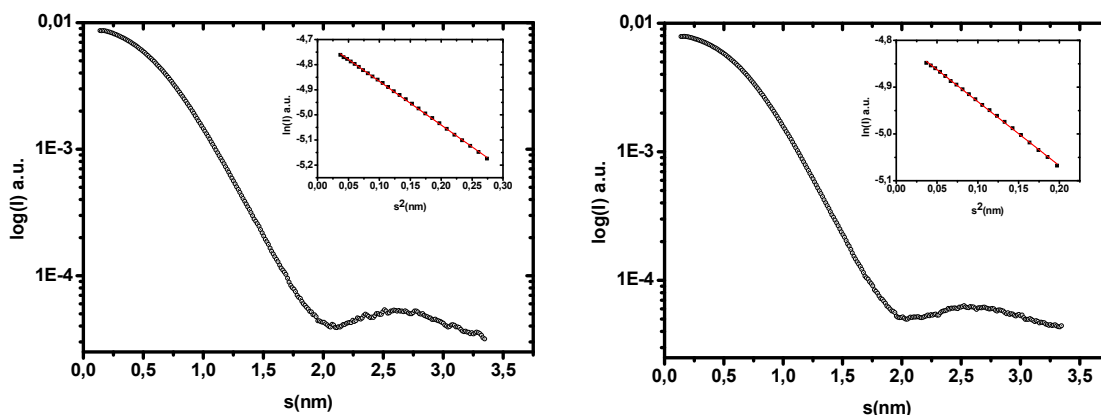


NahG7



NahG8

NahG9



Fonte: o autor.

De modo a obter toda a informação que uma análise de SAXS pode oferecer, utilizam-se diferentes parâmetros que permitem caracterizar uma proteína, um dos mais importantes é o raio de giro, que é a média das distâncias desde a borda da proteína até o seu centro de massa.<sup>75</sup> Esse valor está diretamente relacionado com a forma da molécula e pode ser calculado mediante uma regressão linear conhecida por ajuste de Guinier (Equação 8), válido para o produto de  $s$  e  $R_g$   $< 1,3$ .<sup>76</sup>

$$I_s = I_0 \exp^{-s^2 R_g^2 / 3} \quad \text{(Eq. 8)}$$

onde,  $I_s$  é a intensidade para um ângulo de espalhamento  $s$ ,  $I_0$  é a intensidade no ângulo zero de espalhamento e  $R_g$  é o raio de giro.

Para que o valor de  $R_g$  calculado seja confiável o ajuste de Guinier deve ser linear, indicando que a amostra proteica não apresenta agregação e, portanto, é monodispersa. O valor de  $R_g$  também pode ser calculado através do programa GNOM<sup>77-76</sup> pela transformada indireta de Fourier das curvas de SAXS. A confiabilidade nos valores de  $R_g$  obtidos é dada pelas qualidades dos ajustes e pela comparação dos dois métodos de cálculo.

A partir dos dados na Figura 14, os valores de  $R_g$  foram obtidos para cada amostra utilizando tanto o ajuste de Guinier como a transformada indireta de Fourier. Os ajustes de Guinier estão apresentados no inserto de cada curva de SAXS. Convém observar os casos em que as análises não geraram resultados confiáveis. No gráfico NahG1 da Figura 14, em ângulos de espalhamento mais altos existe uma elevada dispersão dos dados, impedindo uma análise adequada. Desse modo, nas

análises seguintes utilizaram-se concentrações mais elevadas de proteína. A curva NahG3 também foi descartada por não gerar um ajuste de Guinier linear, o que poderia indicar diferentes formas proteicas em solução,<sup>77</sup> causadas pela quantidade insuficiente de FAD necessária para produzir uma única forma proteica. Consequentemente, a curva NahG2 foi descartada, pois, embora apresente um ajuste de Guinier linear, ela não poderia ser diretamente comparada com os demais dados obtidos.

As curvas NahG4 a NahG9 (inserto da Figura 14) produziram ótimos ajustes lineares de Guinier ( $R > 0,999$ ), sugerindo uma amostra proteica monodispersa. Os valores de raio de giro ( $R_g$ ) para essas amostras, como calculados pelos ajustes de Guinier, estão apresentados na Tabela 3 juntamente com os valores calculados pela transformada indireta de Fourier. Nesta tabela também são apresentados os valores de  $I_0$ , que servem de parâmetro comparativo entre as análises com diferentes concentrações de proteína.

**Tabela 3. Valores de  $R_g$  obtidos para a amostra NahG na ausência e presença de FAD e dados relacionados as medidas de SAXS.** Os valores de  $R_g$  foram obtidos do ajuste de Guinier e transformada indireta de Fourier (TIF) a partir do programa GNOM para as curvas NahG4 a NahG9 (vide Figura 14).

	[NahG]/[FAD] ( $\mu\text{M}$ )	$I_0$	Tempo de exposição(s)	$R_g$ Guinier (Å)	$R_g$ TIF (Å)
<b>NahG4</b>	201,4/520,0	$9,61 \times 10^{-3}$	420	24,40	24,10
<b>NahG5</b>		$7,62 \times 10^{-3}$	420	23,90	23,30
<b>NahG6</b>	296,8/520,0	$9,16 \times 10^{-3}$	600	22,80	23,60
<b>NahG7</b>		$8,28 \times 10^{-3}$	600	20,30	22,20
<b>NahG8</b>	233,0/520,0	$1,15 \times 10^{-2}$	600	22,00	23,20
<b>NahG9</b>		$1,24 \times 10^{-2}$	600	19,90	21,20

Fonte: o autor.

Conforme observado na Tabela 3, os valores de  $R_g$  calculados por ambos os métodos, Guinier e TIF, geram valores muito próximos entre si, o que confere boa confiabilidade à análise realizada. A relação  $I_0/[NahG]$  é, dentro do erro inerente de análise, visualmente independente da concentração de proteína, de modo que as conclusões experimentais referentes as curvas NahG4 a NahG9, em uma

concentração definida de proteína na presença e ausência de FAD, podem ser consideradas similares.

Assim, se observa que para cada concentração de proteína, a presença do FAD leva a uma diminuição do raio de giro. Essa diminuição pode ser atribuída a uma mudança estrutural com a ligação do FAD na NahG. Para confirmar se esta variação provém de uma mudança estrutural foi calculado o volume de correlação, que é outro parâmetro que independe da concentração da proteína (Tabela 4). O volume de correlação ( $V_c$ ) é dado pela Equação 9,

$$V_c = \frac{V_p}{2\pi l_c} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde,  $V_p$  é o volume da partícula e  $l_c$  é o comprimento da partícula conforme calculado pelo programa SCATTER<sup>78</sup> a partir dos dados na Figura 14. Assim, a correlação com esses parâmetros deve causar uma variação em  $V_c$  que é diretamente relacionada a uma mudança estrutural.

**Tabela 4. Valores de  $V_c$  obtidos para apo NahG na ausência e presença de FAD.** Os valores de  $V_c$  foram calculados pelo programa SCATTER<sup>TM</sup> a partir dos dados na Figura 14. A razão  $V_c/R_g$  independente da concentração indica uma boa correlação entre estes dois parâmetros;  $R_g$  refere ao valor calculado por TIF.

	[NahG]/[FAD] ( $\mu\text{M}$ )	$V_c$ ( $\text{\AA}^2$ )	$V_c/R_g$
<b>NahG4</b>	201,4/520,0	352,1	14,6
<b>NahG5</b>		339,9	14,6
<b>NahG6</b>	296,8/520,0	332,6	14,1
<b>NahG7</b>		295,5	13,3
<b>NahG8</b>	233,0/520,0	324,9	14,0
<b>NahG9</b>		229,7	10,8

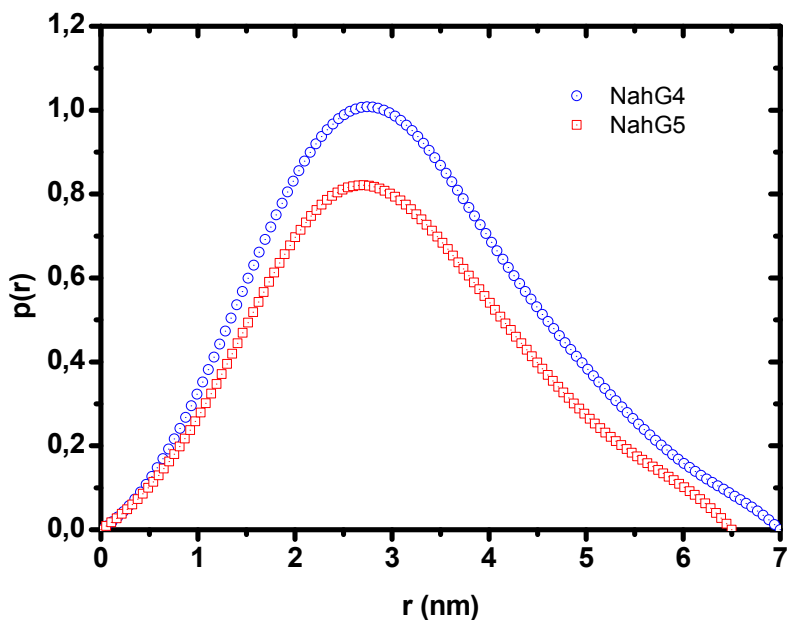
Fonte: o autor.

Como pode ser observado na Tabela 4, o volume de correlação calculado para as amostras que não contém o FAD é superior ao observado para todas as amostras na sua presença, indicando que a NahG sofre uma contração estrutural com a ligação do cofator, o que concorda com os dados de  $R_g$  obtidos. As demais análises a seguir foram realizadas apenas com o par de amostras NahG4 e NahG5,

visto que este apresenta a razão  $[FAD]/[apo\ NahG]$  mais elevada dentre todas as medidas.

A Figura 15 mostra as distribuições de distâncias  $p(r)$  para 201,4  $\mu\text{M}$  de apo NahG na ausência e na presença de 520,0  $\mu\text{M}$  de FAD, amostras NahG4 e NahG5, respectivamente. Correlações desse tipo representam as distribuições prováveis dos pares de distâncias entre os centros de espalhamento (átomos) da proteína. Basicamente, o perfil da distribuição de distâncias  $p(r)$  pode indicar a forma da proteína em solução, assim, uma curva de  $p(r)$  com perfil gaussiano pode indicar uma partícula globular.<sup>77</sup>

**Figura 15. Função de distribuição de pares de distâncias obtida a partir das curvas de espalhamento da apo NahG na na ausência e presença de FAD.** As distribuições foram construídas a partir das curvas de NahG4 (201,4  $\mu\text{M}$  apo NahG) e NahG5 (201,4  $\mu\text{M}$  apo NahG + 520,0  $\mu\text{M}$  FAD). O perfil em forma de sino, com um máximo centrado, é típico de um espalhamento de partículas globulares em solução.



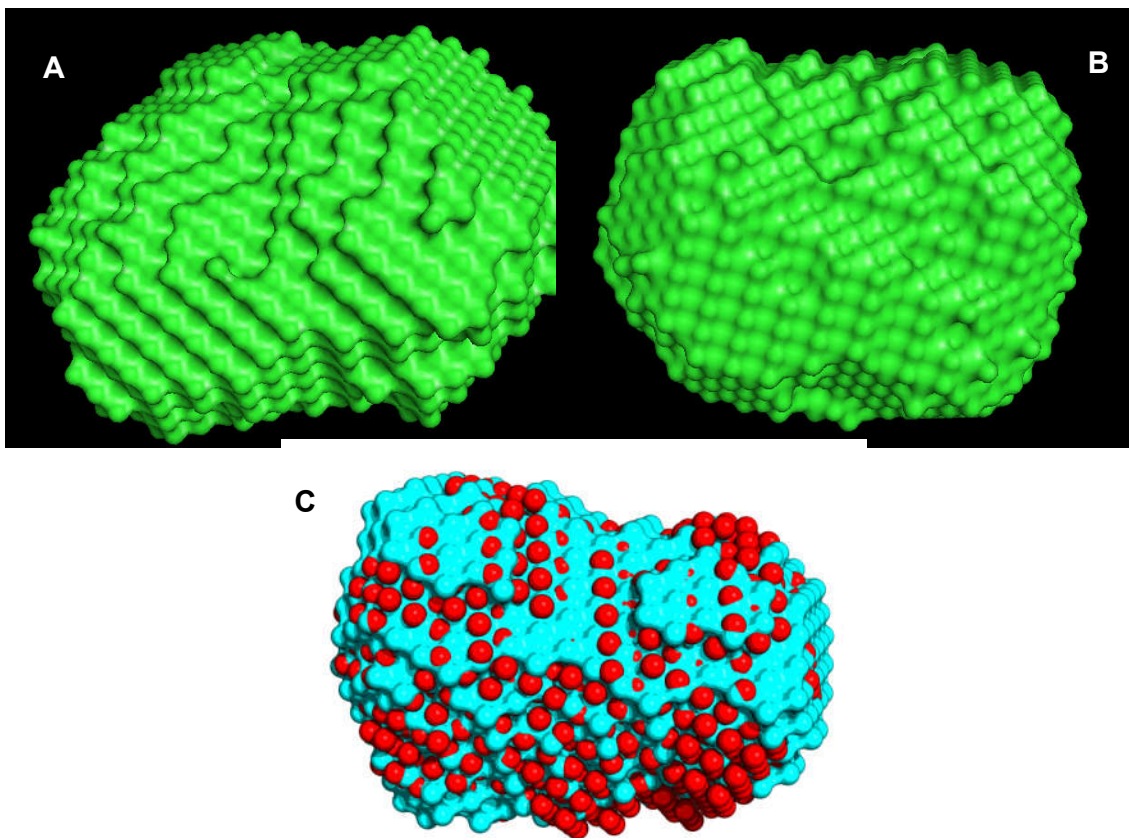
Fonte: o autor.

Observa-se que o perfil obtido para as amostras NahG4 e NahG5 apresentam o perfil gaussiano que indica uma proteína globular. Além disso, observa-se também

que a amplitude do perfil na presença de FAD é mais baixo que na sua ausência, indicando que a proteína ligada ao cofator apresenta uma estrutura mais compacta.

Os dados de  $\rho(r)$  das amostras NahG4 e NahG5 foram utilizados para gerar os modelos em baixa resolução mostrados na Figura 16. Esses modelos de baixa resolução fornecem um bom indício da estrutura da proteína em solução. Os modelos nas Figuras 16A e 16B estão orientados sob o mesmo plano, podendo se observar que a NahG ligada ao FAD (Figura 16B) apresenta uma estrutura mais compacta que a não-ligada a FAD (Figura 16A). Esse comportamento pode ser inferido pela análise dos modelos sobrepostos (Figura 16C), em que o modelo proteico com FAD (em vermelho) parece estar envolvido na sua maior parte pelo modelo proteico não-ligado (em azul).

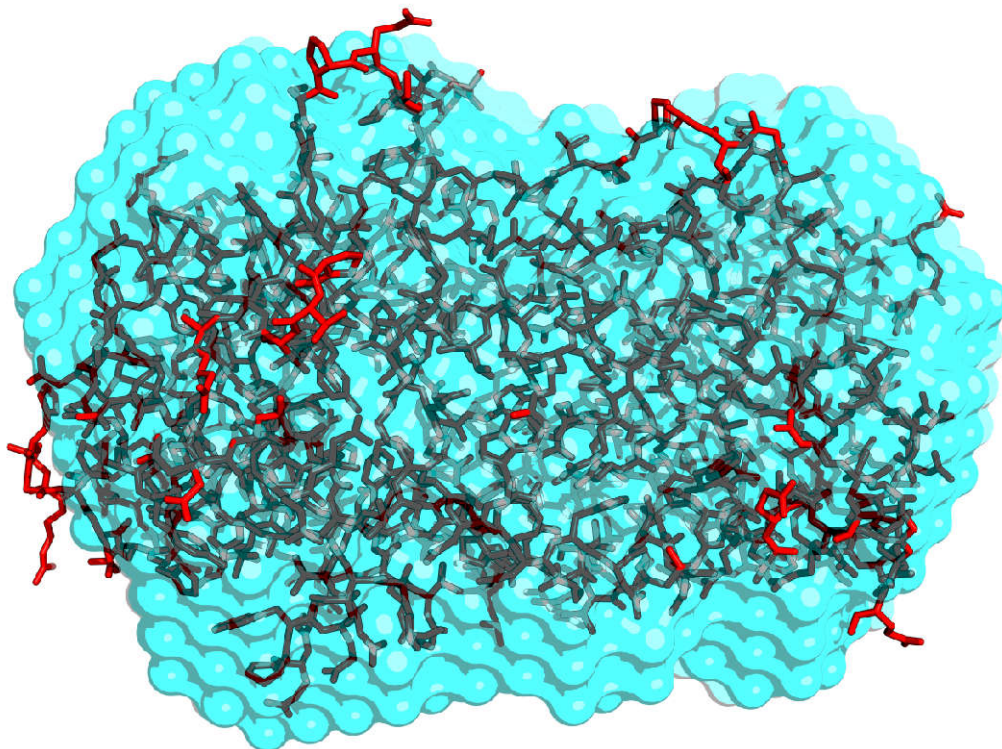
**Figura 16. Modelos de átomos fictícios (*Dummy Atom Model*) gerados para apo NahG na ausência e presença de FAD. A.** NahG4 - 201,4  $\mu\text{M}$  apo NahG; **B.** NahG5 - 201,4  $\mu\text{M}$  apo NahG + 520,0  $\mu\text{M}$  FAD; **C.** Modelos de NahG4 (azul) e NahG5 (vermelho) sobrepostos.



Fonte: o autor; a figura foi gerada utilizando o programa Dammin 5.0.<sup>65</sup>

O modelo estrutural obtido por cristalografia de raios-X da proteína 6xHis-NahG não-ligada a FAD<sup>60</sup> foi ajustado, utilizando o programa SUPCOMB,<sup>67</sup> dentro do modelo de baixa resolução obtido a partir dos dados de SAXS para a amostra NahG4 (Figura 17). Há uma boa concordância entre os dois modelos com um NSD (do inglês, *Normalized Spatial Discrepancy*) de 0,89; para uma superimposição ideal, o valor de NSD tende a zero e valores que excedem 1 indicam que os modelos sob comparação diferem sistematicamente um do outro.

**Figura 17. Sobreposição entre os modelos obtidos por SAXS e por difração de raios-X para apo 6xHis-NahG.** Em azul está o modelo de átomo fictício (Dummy Atom Model) gerado por SAXS para a amostra NahG4 e em vermelho o modelo gerado por difração de raios-X.<sup>60</sup>



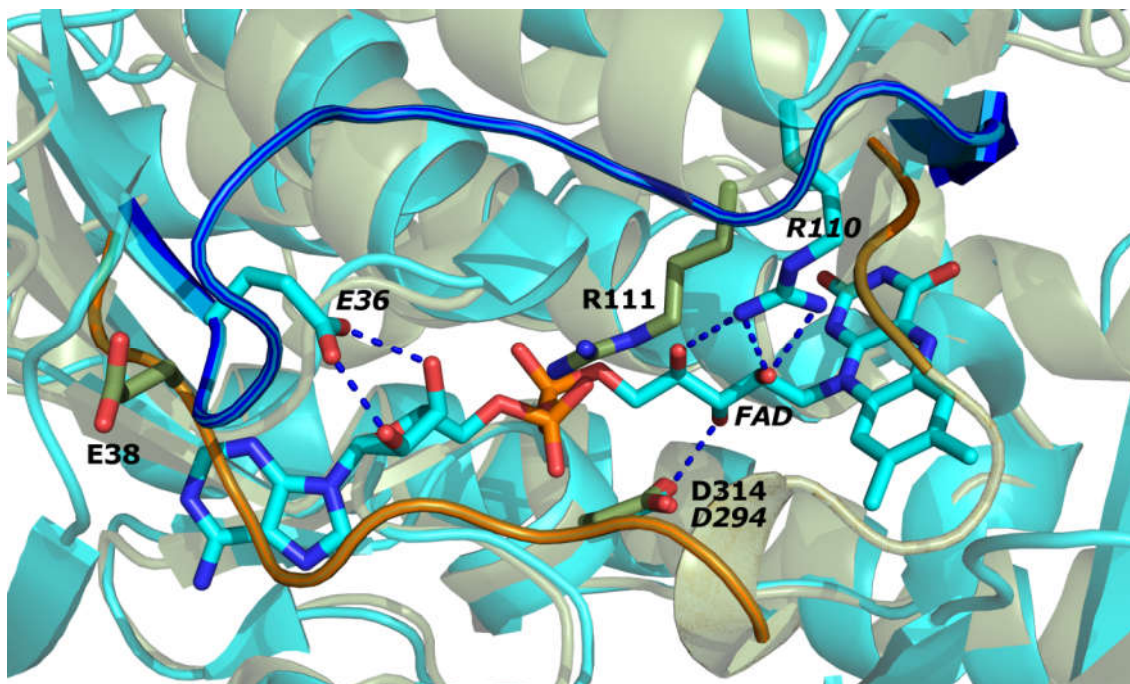
Fonte: o autor; a figura foi gerada utilizando o programa Supcomb.<sup>67</sup>

Considerando as observações acima pode-se inferir que a ligação do FAD na apo NahG causa mudanças estruturais que levam a uma estrutura mais compacta. Estudos mais aprofundados são necessários por métodos de maior resolução estrutural para determinar com exatidão quais resíduos estão envolvidos na dinâmica proteica. Contudo, baseado nos dados das Figuras 15 e 16, podemos já propor que as mudanças estruturais causadas pela ligação do FAD não ocorrem unicamente em uma pequena região da proteína, mas envolve regiões mais afastadas do sítio de ligação do FAD.

Adiantando-se às observações de tais estudos mais aprofundados, a seguir realizamos uma análise comparativa da sobreposição das estruturas da 3HB6H ligada a FAD (PDB ID 4BJZ) e da apo 6xHis-NahG NahG. Convém lembrar que essas enzimas apresentam elevada similaridade estrutural (RMSD = 1,763Å para 258 átomos). A análise é realizada considerando as relações de conservação de resíduos de aminoácidos em enzimas da mesma família.<sup>60</sup>

Conforme observado na Figura 18, um resíduo conservado de glutamato (E38 na NahG e E36 na 3HB6H) é encontrado próximo da base da alça FAD realizando ligações de hidrogênio específicas com as hidroxilas 2' e 3' da ribose do FAD. Essa interação completa as interações com FAD que ocorrem com um resíduo conservado de aspartato (D314 na NahG e D294 na 3HB6H) e outro parcialmente conservado de arginina (R111 na NahG e R110 na 3HB6H) presentes em uma região distal em relação a alça FAD.

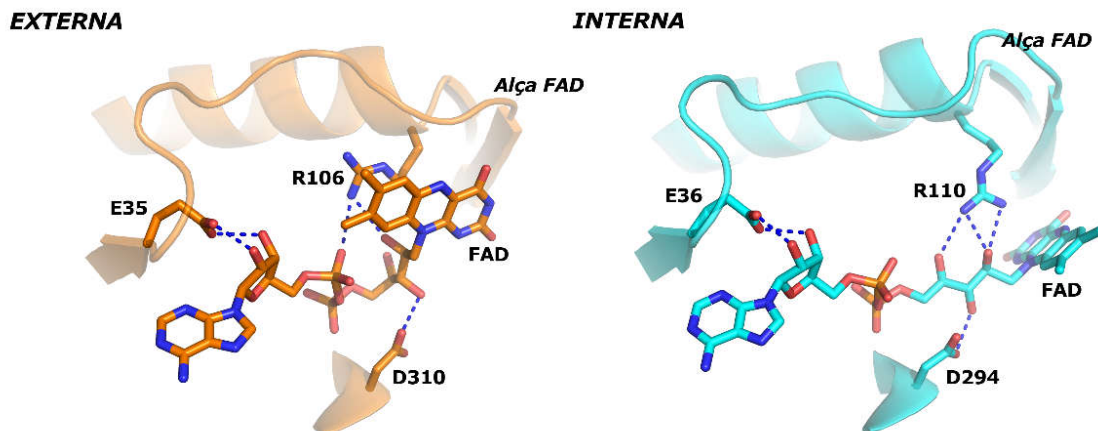
**Figura 18. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando a resíduos importantes na dinâmica da alça de ligação do FAD (Alça FAD).** A 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) com PDB ID 4BJZ esta em cinza, ligada a FAD e com sua alça FAD (resíduos 34-50) mostrada em azul. A posição desta alça difere da 6xHis-NahG não-ligada a FAD, mostrada em verde com sua alça FAD (resíduos 36-52) em laranja. Os resíduos de 3HB6H estão indicados em itálico. As ligações de hidrogênio (tracejado em azul) envolvendo esses resíduos referem a distâncias doador-aceptor entre 2,6 e 3,1 Å.



Fonte: o autor; a figura foi gerada a partir dos respectivos PDBs utilizando o programa Pymol 1.5.<sup>72</sup>

A influência de eventos dinâmicos para a catálise deve ainda ser estabelecida por estudos futuros. Contudo, pode-se inferir sobre a importância da alça FAD para a catálise baseado na análise das estruturas de raios-X para as enzimas phzS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDB ID 3C96)<sup>79</sup> e 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase de *Rhodococcus jostii* RHA1 (3HB6H, PDB ID 4BJZ),<sup>70</sup> que foram resolvidas com o grupo isoaloxazina do FAD em duas posições diferentes, *externa* e *interna* (Figura 19).

**Figura 19. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando resíduos importantes possivelmente relacionados com a dinâmica da alça de ligação do FAD (Alça FAD) e do grupo isoaloxazina do FAD.** Na esquerda, o grupo isoaloxazina aparece em uma conformação *externa* na enzima phzS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDB ID 3C96). Na direita, o grupo isoaloxazina é observado na conformação *interna* da enzima 3-Hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H, PDB ID 4BJZ). As ligações de hidrogênio (tracejado em azul) envolvendo esses resíduos referem a distâncias doador-aceptor inferiores a 3,2 Å.



Fonte: o autor; a figura foi gerada a partir dos respectivos PDBs utilizando o programa Pymol 1.5.<sup>72</sup>

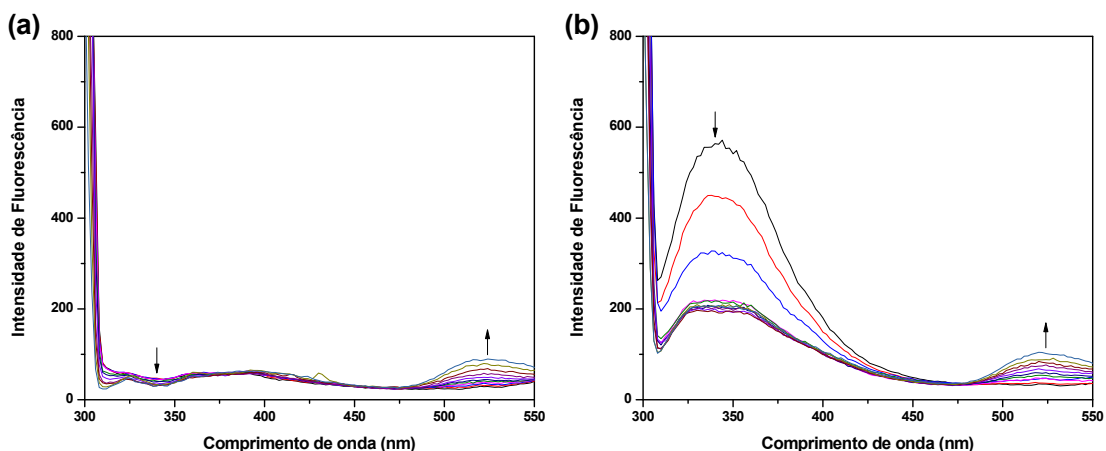
A posição do grupo isoaloxazina entre as conformações *externa* e *interna* parece ser controlada por ligações de hidrogênio específicas entre o grupo ribitol do FAD e um resíduo de arginina (R111 na NahG; R106 na phzS; R110 na 3HB6H), comum em diversas monooxigenases flavodependentes. O resíduo altamente conservado de aspartato (D314 na NahG; D310 na phzS; D294 na 3HB6H), que também realiza ligações de hidrogênio com o grupo ribitol, praticamente não sofre mudanças conformacionais com dinâmica no FAD. Contudo, mudanças conformacionais são observadas na alça FAD, na qual um resíduo de glutamato (E38 na NahG; E35 na phzS; E36 na 3HB6H) altamente conservado é encontrado em sua base. Cabe lembrar que a dinâmica do grupo isoaloxazina do FAD é importante porque a reação com o substrato salicilato ocorre em um ambiente restrito estericamente. Assim, se o FAD estiver em sua forma oxidada e na posição ativa para catálise, restrições espaciais impedem que o NADH promova a sua redução. Visto que, conforme estudos cinéticos, a ligação de NADH e do salicilato ocorre de forma randômica,<sup>57</sup> acredita-se que a alça FAD na NahG tenha elasticidade suficiente para participar da dinâmica do grupo isoaloxazina do FAD.

#### 4.2 Determinação das constantes de ligação de FAD e ácido salicílico (AS) na NahG nativa utilizando titulação fluorimétrica

A determinação das constantes de ligação da NahG nativa com FAD e AS foram conduzidos por espectrofluorimetria utilizando apo 6xHis-NahG após a sua

cauda 6xHis ter sido removida. A Figura 20 apresenta os dados de fluorescência na presença de concentrações crescentes de FAD com excitação em 292 nm. Os espectros (Figura 20a) na ausência de NahG mostram uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência em 340 nm e um aumento mais pronunciado em 524 nm. Na presença de NahG (Figura 20b) observa-se uma forte diminuição da intensidade de fluorescência em 340 nm e um pequeno aumento em 524 nm, de magnitude similar ao observado na ausência de NahG.

**Figura 20. Espectros de fluorescência em concentrações crescentes de FAD na ausência (a) e presença (b) de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.** As concentrações de FAD variaram de 0 a 2,38  $\mu\text{M}$  e a concentração de enzima em (b) variou de 1 a 0,95  $\mu\text{M}$ . O tampão consistiu de 55,6 mM HEPES, 181 mM NaCl e 1,11 mM EDTA ( $I = 0,2$ ). A excitação foi em 292 nm em ambos os casos. As fendas de excitação e emissão foram de 10 nm.

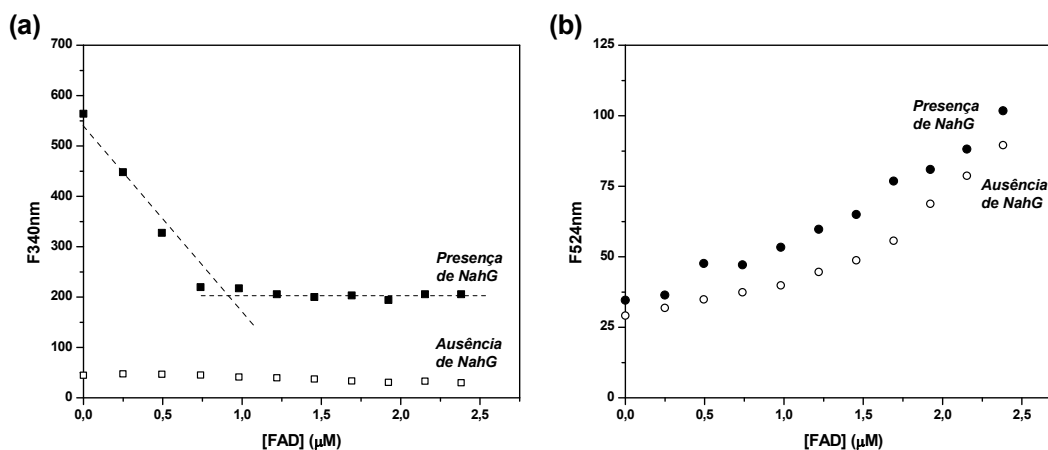


Fonte: o autor.

De modo geral, a excitação em 292 nm em proteínas resulta na emissão de fluorescência em 340 nm. Nessa região, a emissão é devida, quase que exclusivamente, a resíduos de triptofano, que apresentam uma luminosidade (o produto da absorvidade molar e rendimento quântico) muito superior à observada para resíduos de tirosina e fenilalanina, que fluorescem, embora negligenciavelmente, sob as mesmas condições de excitação.<sup>80</sup> A emissão tende a ser perturbada por mudanças do meio, sejam elas causadas por supressão da fluorescência a partir de fatores dinâmicos ou estáticos.<sup>81</sup> Desse modo, a fluorescência pode ser utilizada como diagnóstico de efeitos conformacionais na proteína.<sup>81-82</sup> A emissão em 524 nm é devida exclusivamente a emissão de FAD conforme observado na Figura 20a.

A Figura 21 mostra o comportamento da intensidade de fluorescência em 340 nm (Figura 21a) e 524 nm (Figura 21b) como uma função da concentração de FAD na ausência e presença de apo NahG.

**Figura 21. Intensidade de fluorescência (F) em concentrações crescentes de FAD em 340 nm (a) e 524 nm (b) na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.** As concentrações de FAD variaram de 0 a 2,38  $\mu\text{M}$  e a concentração de enzima em variou de 1 a 0,95  $\mu\text{M}$ . O tampão consistiu de 55,6 mM HEPES, 181 mM NaCl e 1,11 mM EDTA ( $I = 0,2$ ). A excitação foi em 292 nm em ambos os casos. As fendas de excitação e emissão foram de 10 nm. Os espectros estão apresentados na Figura 20.



Fonte: o autor.

O aumento da concentração de FAD causa nenhuma mudança perceptível na emissão em 340 nm na ausência de apo NahG. Na presença de NahG observa-se que a fluorescência decai com um perfil de saturação indicativo da formação de um complexo entre apo NahG e FAD. A intersecção entre as linhas tracejadas na Figura 21a, que ocorre próximo a 1,0  $\mu\text{M}$  de FAD na presença de 1,0  $\mu\text{M}$  de apo NahG, indica a ordem de ligação FAD-apo NahG que pode ser estabelecida como 1:1. Em 524 nm (Figura 21b) observa-se que intensidade de fluorescência do FAD na presença de enzima tem um aumento ligeiramente mais pronunciado do que na sua ausência, o que também é indicativo da formação de um complexo FAD-apo NahG. Esses dados foram tratados, ainda que preliminarmente, seguindo o formalismo de Stern-Volmer (Equação 10)<sup>83</sup>:

$$\frac{F_o}{F_c} = 1 + K_{SV}[FAD] \quad (\text{Eq. 10})$$

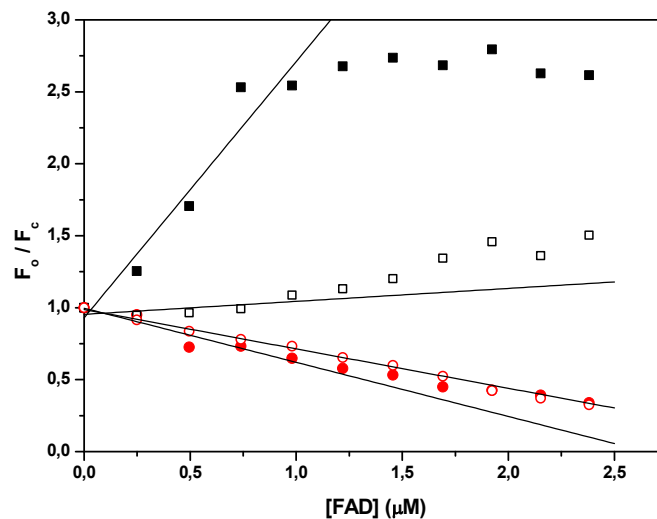
Onde,  $K_{SV}$  é constante de Stern-Volmer, e  $F_o$  e  $F_c$  são as fluorescências na ausência e presença de FAD. Esta equação deve render uma reta passando sobre 1,0, onde a intensidade de fluorescência apresenta um comportamento linear. A  $K_{SV}$  é positiva para processos de supressão da fluorescência e negativa para processos em que há um aumento da emissão de fluorescência do composto adicionado, seja isto pelo aumento da sua concentração ou de seu rendimento quântico. A Tabela 5 apresenta os valores de  $K_{SV}$  obtidos a partir dos dados nas diferentes condições observadas na Figura 22.

**Tabela 5. Valores de  $K_{SV}$  em 340 nm e 524 nm obtidos a partir do aumento da concentração de FAD na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C. Os valores de  $K_{SV}$  foram calculados com a Eq. 10 a partir dos dados na Figura 22.**

	$\lambda_{em}$ (nm)	$K_{SV} \mu M^{-1}$
<b>Presença de NahG</b>	340	1,8 ± 0,3
<b>Ausência de NahG</b>		0,09 ± 0,06
<b>Presença de NahG</b>	524	-(0,38 ± 0,07)
<b>Ausência de NahG</b>		-(0,27 ± 0,02)

Fonte: o autor.

**Figura 22. Intensidade relativa de fluorescência ( $F_o/F_c$ ) em função da concentração de FAD na ausência e presença de apo NahG em pH 8,0 a 25 °C.** Os símbolos em quadrado e círculo representam os dados em 340 e 524 nm na ausência e presença de NahG mostrados na sua ordem por símbolos abertos e fechados. Os dados de intensidade de fluorescência estão apresentados na Figura 21.



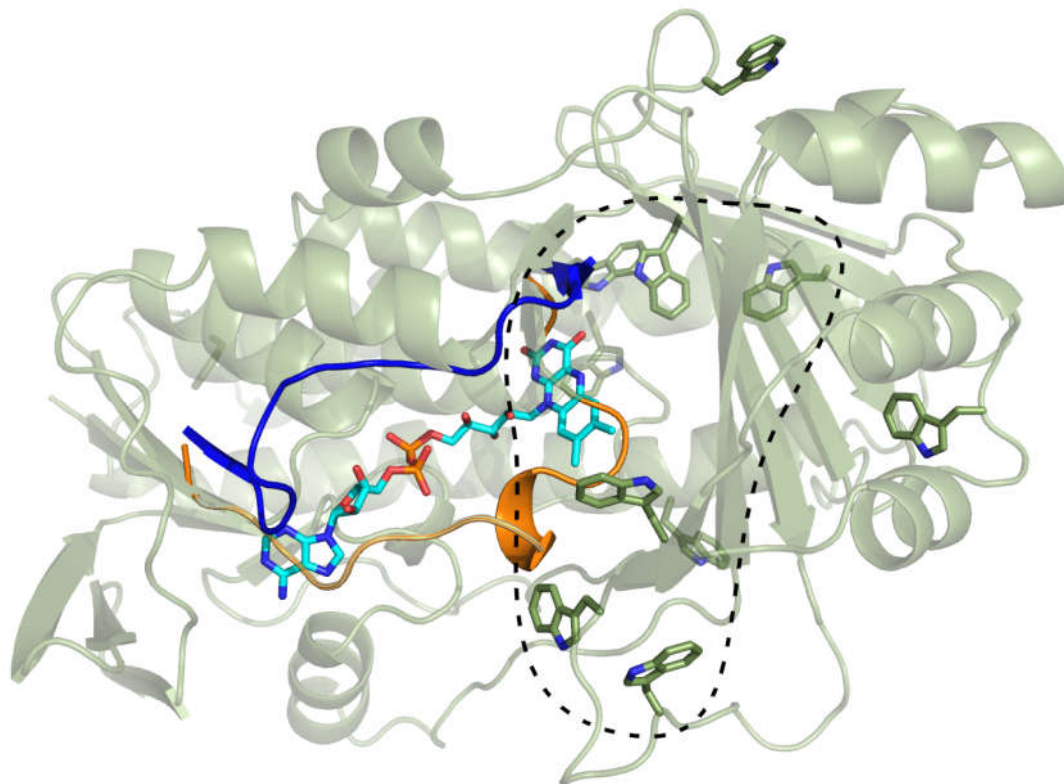
Fonte: o autor.

A  $K_{SV}$  em 340 nm de  $1,8 \mu\text{M}^{-1}$  é indicativo de forte supressão da fluorescência de resíduos de triptofano da NahG. É importante observar que a  $K_{SV}$  em 340 nm na ausência de NahG é negligenciável dentro do erro experimental. A forte supressão em 340 nm na emissão dos resíduos de triptofano é seguida por uma  $K_{SV}$  menos negativa ( $K_{SV} = -0,38 \mu\text{M}^{-1}$ ) em relação à ausência de NahG ( $K_{SV} = -0,27 \mu\text{M}^{-1}$ ). Esse resultado indica que resíduos de triptofano sofrem uma mudança de meio e os próximos ao FAD produzem transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET, do inglês *fluorescence resonance energy transfer*). A FRET é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre o doador (resíduos de triptofano) e o aceptor (FAD),<sup>84</sup> sendo muito sensível a pequenas distâncias que levam a um aumento de rendimento quântico do aceitador, conforme observado em 524 nm.

Conforme se pode observar na Figura 23, onze resíduos de triptofano estão presentes na NahG (estrutura da 6xHis-NahG não-ligada ao FAD). A superposição com a estrutura de 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H, PDB ID 4BJZ) ligada ao FAD mostra que diversos desses resíduos de Trp (indicados dentro da área tracejada) estão próximos do grupo isoaloxazina do FAD e da região que sofre a maior dinâmica com a sua ligação.

**Figura23. Posição de resíduos de triptofano na estrutura de raios-x da NahG.** Estão mostrados os resíduos de Trp nas posições 80, 84, 87, 254, 260, 276, 293, 374, 404, 406 e

423. Dentro da região indicada por tracejado estão diversos resíduos de Trp próximos entre si e ao grupo isoaloxazina do FAD. O FAD provém da estrutura de 3-hidroxi-6-hidroxi-2,4,6-trisubstituído-1,2,3,4-tetra-hidro-1,4-benzoxazin-5(1H)-ona (3HB6H) com PDB ID 4BJZ, ligada a FAD e com sua alça FAD (resíduos 34-50) mostrada em azul. A posição desta alça (resíduos 36-52) difere da 6xHis-NahG não-ligada a FAD mostrada em laranja.



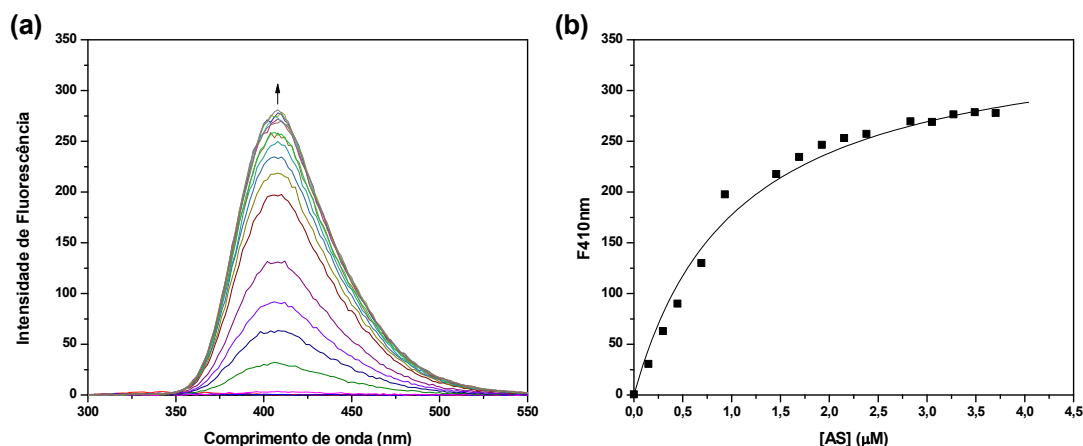
Fonte: o autor; a figura foi gerada a partir dos respectivos PDBs utilizando o programa Pymol 1.5.<sup>72</sup>

O aumento da concentração de ácido salicílico (AS) em soluções de 1,0  $\mu\text{M}$  de NahG contendo 1,5  $\mu\text{M}$  de FAD leva a um aumento da intensidade de fluorescência em 410 nm (Figura 24). Esse aumento apresenta um perfil de saturação (Figura 24b) que concorda com uma isoterma de Langmuir do tipo 1:1 (Equação 11).<sup>85</sup>

$$F_{obs} = \frac{B_{max}[AS]}{K_d + [AS]} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde,  $K_d$  e  $B_{max}$  representam na sua ordem a constante de dissociação do complexo 1:1 AS-holo NahG e o valor de intensidade de fluorescência máximo do complexo.

**Figura 24. Dados de fluorescência em concentrações crescentes de AS em soluções de holo NahG em pH 8,0 a 25 °C.** Em (a) estão os espectros de fluorescência; em (b) os valores de intensidade de fluorescência em 410 nm. A solução de holo NahG consistiu de 1  $\mu\text{M}$  de apo NahG e 1,5  $\mu\text{M}$  de FAD. O tampão consistiu de 55,6 mM HEPES, 181 mM NaCl e 1,11 mM EDTA ( $I = 0,2$ ). A excitação foi em 292 nm e as fendas de excitação e emissão foram de 2,5 nm.



Fonte: o autor.

A emissão em 410 nm é devida na sua maior parte ao AS, que apresenta um comportamento típico de transferência de próton no estado excitado (ESIPT), que é favorecido no sítio de ligação na NahG. A constante de formação  $K_d$  calculada pelo ajuste não linear dos dados da Figura 24b com a Equação 11 foi de  $1,04 \pm 0,14 \mu\text{M}$ , indicando que a holo NahG liga de forma muito efetiva o AS.

### 4.3 Estudos cinéticos da NahG nativa e mutantes: Determinação de parâmetros cinéticos e análise do mecanismo de reação

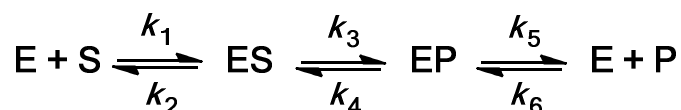
Os estudos cinéticos basearam-se em três partes: 1. A determinação de parâmetros cinéticos básicos e estudos em função do pH para a NahG nativa; 2. A comparação desses dados com aqueles obtidos para as NahG mutantes H110N e H332Y; 3. Avaliação da demanda eletrônica na catálise da NahG nativa.

#### 4.3.1 Parâmetros cinéticos básicos e estudos em função do pH para a NahG nativa

De modo a nortear a discussão em torno dos estudos cinéticos apresentados nesta seção, sumarizamos a seguir alguns conceitos importantes. A velocidade de reação foi determinada seguindo o método de velocidades iniciais conforme apresentado na seção de Materiais e Métodos. A variação na concentração de NADH como uma função do tempo foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis e Fluorimetria.

A enzima livre (E) pode se combinar ao substrato (S) com uma constante de velocidade  $k_1$ , formando um complexo enzima-substrato (ES), que pode se dissociar a reagentes com uma constante de velocidade  $k_2$  ou sofrer uma reação em que o substrato ligado é convertido a produto por uma constante  $k_3$ . Outra reação possível, envolve a reação do produto ligado a enzima (EP) para render novamente o complexo ES com uma constante de velocidade  $k_4$ . A ligação do produto na enzima é governada pelas constantes de velocidade  $k_5$  (dissociação) e  $k_6$  (associação). O Esquema 11 ilustra esse modelo cinético.<sup>86</sup>

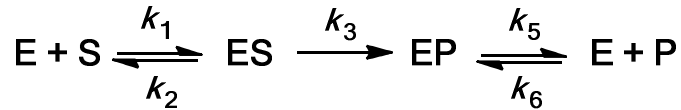
**Esquema 11. Modelo cinético completo para a reação de uma enzima (E) com um substrato (S).** Sobre as setas de equilíbrio estão as constantes cinéticas que regem cada etapa:  $k_1$  e  $k_4$  são na sua ordem as constantes de formação do complexo enzima-substrato (ES) a partir dos reagentes e produtos,  $k_2$  é a constante de velocidade de dissociação de ES e  $k_3$  é a constante de velocidade para a reação de substrato a produto ligado a enzima. As constantes  $k_5$  e  $k_6$  referem as velocidades de dissociação e associação do produto com a enzima.



Fonte: o autor.

O modelo cinético no Esquema 11 é relativamente complexo face às muitas constantes envolvidas. O método de velocidades iniciais permite uma simplificação valiosa, pois ao se considerar somente os momentos iniciais da reação, a variação da concentração de substrato é pequena, mantendo-se muito acima da concentração da enzima. A quantidade de produto formada também é muito pequena, de modo que a reação de retorno envolvendo a conversão de produtos a reagentes pode ser descartada. Tendo isto em consideração a equação química no Esquema 11 pode ser reescrita para dar origem à equação representada no Esquema 12, que segue o chamado modelo de Michaelis-Menten. É importante mencionar que em certos casos, quando o equilíbrio é altamente deslocado no sentido dos produtos, é comum que a influência do produto também seja muito pequena, visto que  $k_4$  é muito menor do que  $k_3$ .<sup>87</sup>

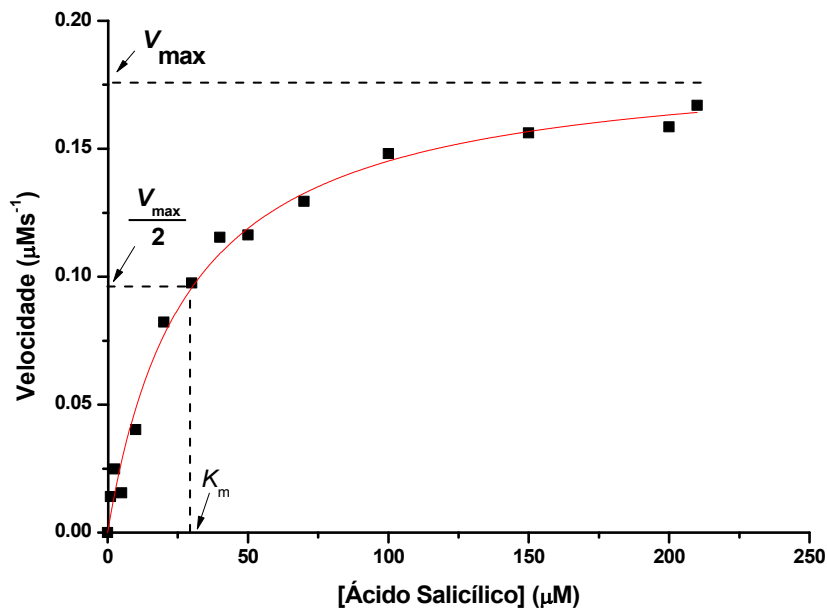
**Esquema 12. Modelo cinético simplificado de catálise enzimática considerando a determinação das constantes cinéticas pelo método de velocidades iniciais.** A influência de  $k_4$  (*vide* Esquema 11) pode ser descartada quando a concentração de produto, e portanto, do complexo EP, é pequena.



Fonte: o autor.

Um perfil de velocidade em função da concentração de substrato que é regido pelo caminho reacional mostrado no Esquema 12 e tem a etapa  $k_3$  como determinante da velocidade reacional está mostrado na Figura 25. Esse é o perfil típico observado em todos os experimentos cinéticos deste trabalho, sendo, na Figura 25, determinado em pH 8,0 a 25 °C para a reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG ao custo de NADH.

**Figura 25. Curva de velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico para a conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG ao custo de NADH em pH 8,5 e 25 °C.** A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e as grandezas  $K_m$  e  $V_{max}$  de 30,0  $\mu\text{M}$  e 0,186  $\mu\text{M s}^{-1}$ , respectivamente, indicadas no gráfico. Dados: [NahG] = 0,064  $\mu\text{M}$ , [FAD] = 31,5  $\mu\text{M}$  e [NADH] = 200  $\mu\text{M}$ ; Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e  $I_{de}$  0,2 (NaCl).



Fonte: o autor.

O modelo cinético no Esquema 12 pode ser tratado de modo conveniente seguindo o princípio do estado estacionário, que pode ser expresso conforme a Equação 12:

$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_2 + k_3)[ES] - k_1[E][S] \quad \text{(Eq. 12)}$$

de modo que, considerando que a taxa de variação da concentração do complexo ES em função do tempo permanece constante e, portanto, igual a zero, a concentração do complexo ES pode ser expressa conforme abaixo:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2+k_3)/k_1} \quad \text{(Eq. 13)}$$

tendo que,  $(k_2+k_3)/k_1$  é um conjunto de constantes que podem ser representadas, convenientemente, pela constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) tem-se que:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad \text{(Eq. 14)}$$

onde, é importante observar que  $K_m$  é uma grandeza cinética com valores típicos entre  $10^{-1}$  e  $10^{-7}$  dependendo do substrato e das condições do meio, como pH, temperatura e força iônica.<sup>87</sup> Para um determinado sistema, pequenos valores de  $K_m$  indicam uma taxa de variação da velocidade mais alta e valores maiores a uma taxa de variação menor. Este valor também tem um significado termodinâmico, pois indica a afinidade da enzima pelo substrato, uma vez que representa uma constante de dissociação de ES dada pela razão  $[E][S]/[ES]$ .

A  $[ES]$  pode ser expressa em função da concentração total de enzima  $[E]_o$ , pois  $[E]_o = [E] + [ES]$ , e na condição em que  $[S] \gg [ES]$ , de modo que  $[S]_o = [S] + [ES] \approx [S]$ :

$$[ES] = [E]_o \frac{[S]}{[S]+K_m} \quad \text{(Eq. 15)}$$

Visto que a etapa  $k_3$  é determinante, a velocidade reacional pode ser expressa pela Equação 16, em que a  $[ES]$ , conforme indicado na Equação 15, é substituída para originar a Equação 17, que representa a lei de velocidade para o processo:

$$v = k_3[ES] \quad \text{(Eq. 16)}$$

$$v = k_3[E]_o \frac{[S]}{[S]+K_m} \quad \text{(Eq. 17)}$$

A constante  $k_3$ , mais comumente conhecida por constante catalítica ( $k_{cat}$ ), relaciona-se com a concentração total de enzima  $[E]_o$  por  $V_{max}$ , que é a velocidade máxima alcançada quando todos os centros catalíticos da enzima estão ocupados pelo substrato. Por sua vez,  $k_{cat}$  ou número de renovação compreende ao número de moléculas de substrato convertidas a produto por uma molécula de enzima em uma

unidade de tempo quando a enzima estiver sob condições de  $V_{max}$ . Assim,  $V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$  e o modelo de Michaelis-Menten pode ser representado pela Equação 18:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Eq. 18})$$

É importante observar pela análise dessa equação que  $K_m$  representa a concentração de substrato necessária para atingir metade do valor de  $V_{max}$  ( $V_{max}/2$ ), conforme mostrado na Figura 25.

O modelo apresentado acima foi o típico para os substratos AS e dioxigênio ( $O_2$ ), bem como para os cofatores FAD e NADH (Figura 26) em pH 8,0 e 25 °C. Os parâmetros cinéticos obtidos pelo tratamento dos dados experimentais com a Eq. 18 estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Parâmetros cinéticos para ácido salicílico, dioxigênio, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.** Os valores foram calculados segundo o modelo de Michaelis-Menten e os dados apresentados na Figura 26.

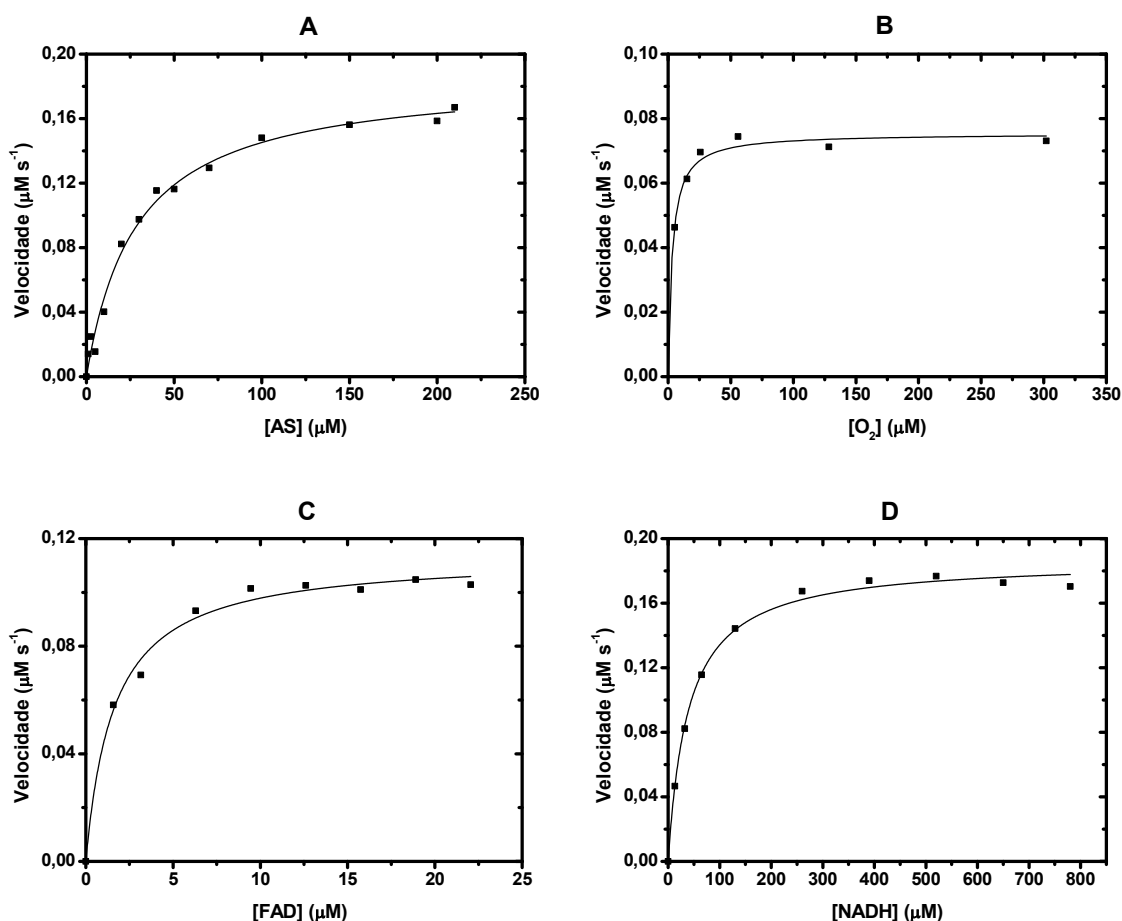
Parâmetros	AS	O <sub>2</sub>	FAD	NADH
$K_m$ (μM)	30,0± 1,5	3,2± 0,3	1,61± 0,12	39,2± 1,7
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	0,337			

Fonte: o autor.

Conforme observado na Tabela 6, os valores de  $K_m$  para os substratos e cofatores são baixos em todos os casos e na mesma ordem de magnitude do observada na literatura.<sup>44,55,88-90</sup> O valor de  $K_m$  para FAD é comparável a  $1/K_{SV}$  de 0,6 μM determinado por espectrofluorimetria (p. 48) e indica que a enzima o liga fortemente, tal qual observado para outras oxigenases flavodependentes. O valor de  $K_m$  para  $O_2$  é também extremamente baixo, como consequência do fato que a reação entre  $O_2$  e flavina para formar o complexo C4a-hidroperoxiflavina é altamente favorável. Por outro lado, o valor de  $K_m$  para NADH e ácido salicílico são relativamente mais elevados, indicando uma afinidade mais baixa. No caso de ácido salicílico, o valor de  $K_m$  é cerca de 30 vezes mais elevado que a  $K_d$  de 1,04 μM determinada por espectrofluorimetria (p. 51). Assim, tomando como base os dados de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $K_d$  para AS e tendo que  $K_m = (k_2 + k_{cat})/k_1$  e  $K_d = k_2/k_1$ , podem-se calcular os valores de  $k_1$  e  $k_2$  de  $1,16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $0,0121 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

Dessa forma, tendo em conta o baixo valor de  $K_m$  para  $O_2$ , tem-se em conta que a etapa determinante de velocidade de reação deve ser posterior a qualquer evento de formação da C4a-hidroperoxiflavina e de ligação do AS.

**Figura 26. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico (A), dióxigênio (B), FAD (C) e NADH (D) para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.** A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e os parâmetros apresentados na Tabela 5. Dados: [NahG] = 0,064  $\mu\text{M}$ ; Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e  $I_{de}$  0,2 (NaCl); exceto onde a concentração foi variada, as concentrações de AS, FAD e NADH foram 192  $\mu\text{M}$ , 31,5  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



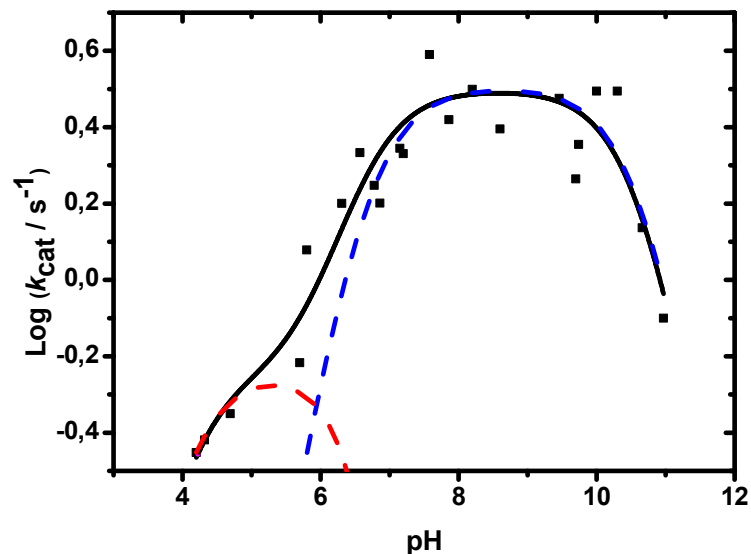
Fonte: o autor.

Vários fatores são capazes de alterar a eficiência catalítica de uma enzima fornecendo informações úteis com relação ao seu mecanismo de ação. Entretanto, a mudança de pH do meio reacional é crucial em estudos enzimáticos em solução

aquosa, pois mesmo pequenas mudanças na acidez do meio podem afetar o estado de protonação de resíduos do sítio ativo causando, por consequência, uma diminuição da atividade enzimática em relação ao pH ótimo. Nesse sentido, o dado mais útil é  $k_{cat}$ , pois neste a influência da constante de ligação dos substratos e cofatores é desconsiderada, permanecendo a informação mais útil sobre as etapas catalíticas após a formação do complexo ES. Nesse caso, é importante enfatizar que, esses estudos foram conduzidos em excesso de substratos e cofatores em relação aos valores de  $K_m$  no pH ótimo de 8,0 para a NahG nativa. Todavia, os valores de  $K_m$  permitem inferir sobre resíduos envolvidos na ligação dos substratos e cofatores.

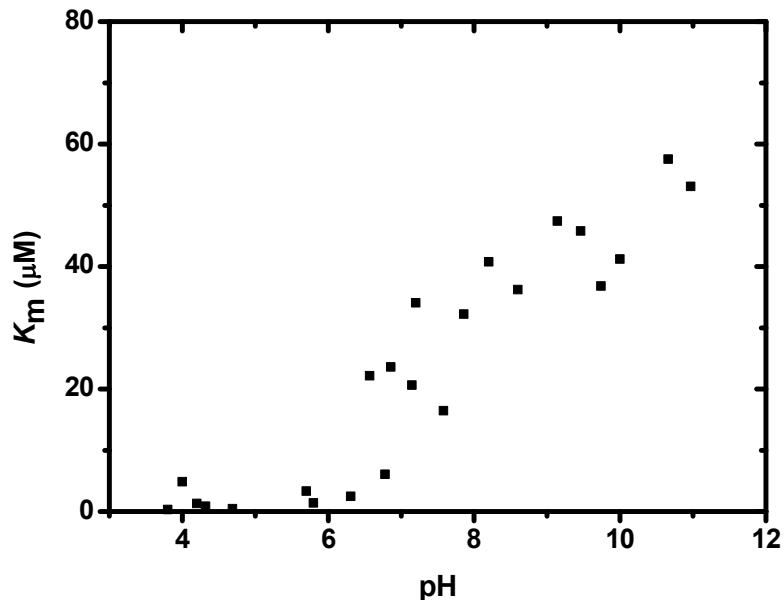
A Figura 27 apresenta o perfil de  $\text{Log } k_{cat}$  como uma função do pH para NahG nativa. A Figura 28 apresenta o perfil de  $K_m$  como uma função do pH.

**Figura 27. Efeito do pH sobre  $\text{Log } k_{cat}$  para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pela NahG nativa a 25 °C.** A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação 20 e os parâmetros apresentados na Tabela 6. As curvas tracejadas em azul e vermelho representam, respectivamente, a influência individual de  $k^{max}$  e  $k^i$ . Dados:  $[\text{FAD}] = 31,5\mu\text{M}$  e  $[\text{NADH}] = 200\mu\text{M}$ ; Tampões 50 mM contendo 1,0 mM EDTA e  $I$  de 0,2 (NaCl).



Fonte: o autor.

**Figura 28. Efeito do pH sobre  $K_m$  para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pela NahG nativa a 25 °C.** Dados:  $[\text{FAD}] = 31,5\mu\text{M}$  e  $[\text{NADH}] = 200\mu\text{M}$ ; Tampões 50 mM contendo 1,0 mM EDTA e  $I$  de 0,2 (NaCl).

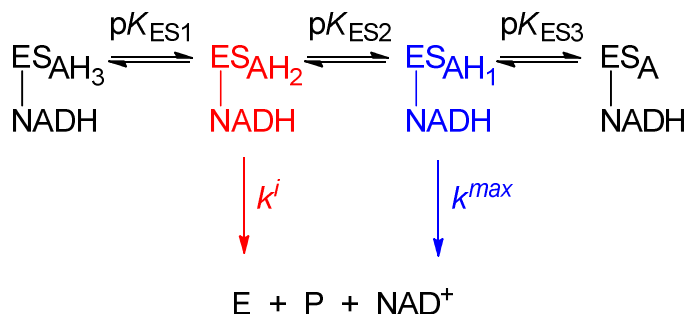


Fonte: o autor.

Os dados de  $\text{Log } k_{\text{cat}}$  apresentam um perfil típico em forma de sino (Figura 27). No lado básico tem-se um comportamento em que  $\text{Log } k_{\text{cat}}$  diminui com um coeficiente angular de -1, o que é característico para a desprotonação de um único grupo catalítico, mais eficiente na sua forma ácida. No lado ácido do sino, o  $\text{Log } k_{\text{cat}}$  diminui com um coeficiente angular de 0,25 (ou 1/4 de próton transferido) que indica que pelo menos duas espécies ativas da enzima e três constantes de acidez contribuem para a reação enzimática (Esquema 13). A espécie  $\text{ES}_{\text{AH}_1}$  é a mais ativa e catalisa a reação através de  $k^{\text{max}}$ , enquanto que  $\text{ES}_{\text{AH}_2}$  é a menos ativa e converte o substrato a produto através de  $k^i$ . As espécies  $\text{ES}_{\text{AH}_3}$  e  $\text{ES}_A$  são inativas cataliticamente.

Por sua vez, o perfil de  $K_m$  como uma função do pH apresenta um perfil sigmoide com valores mais baixos em meios mais ácidos onde a ligação de AS deve ser mais efetiva.

**Esquema 13. Caminho reacional e espécies envolvidas na ação catalítica da NahG nativa.** Apenas as espécies  $\text{ES}_{\text{AH}_1}$  e  $\text{ES}_{\text{AH}_2}$  são ativas convertendo o substrato a produto através de  $k^{\text{max}}$  e  $k^i$ , respectivamente.



Fonte: o autor.

Levando em consideração o caminho reacional no Esquema 13 pode-se expressar a  $k_{cat}$  em função da fração molar das espécies catalíticas envolvidas:

$$k_{cat} = k^i \cdot \chi_{ESAH2} + k^{max} \cdot \chi_{ESAH1} \quad (\text{Eq. 19})$$

Expressando as frações molares como uma função das constantes  $K_{ES1}$ ,  $K_{ES2}$  e  $K_{ES3}$ , e o balanço de massa que considera que  $[ES]_0 = [ESAH_3] + [ESAH_2] + [ESAH_1] + [ESA]$  têm-se a Equação 20:

$$k_{cat} = \frac{k^i}{\frac{[H^+]}{K_{ES1}} + 1 + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} + \frac{K_{ES2}K_{ES3}}{[H^+]^2}} + \frac{k^{max}}{\frac{[H^+]^2}{K_{ES2}K_{ES1}} + \frac{[H^+]}{K_{ES2}} + 1 + \frac{K_{ES3}}{[H^+]}} \quad (\text{Eq. 20})$$

A forma logarítmica da Equação 20 foi utilizada no ajuste não-linear dos dados da Figura 27, gerando a curva sólida e os parâmetros cinéticos e de equilíbrio mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7. Parâmetros cinéticos e de equilíbrio para a reação de descaboxilação oxidativa de ácido salicílico pela enzima NahG a 25,0 °C.** Os parâmetros foram obtidos pelo ajuste não-linear (linha sólida) dos dados na Figura 27 utilizando a Eq. 20.

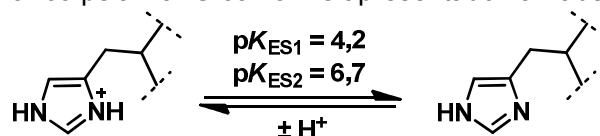
Parâmetros	Valores
$k^i(\text{s}^{-1})$	0,59±0,08
$k^{max}(\text{s}^{-1})$	3,2±0,2
$pK_{ES1}$	4,2±0,6
$pK_{ES2}$	6,7±0,2
$pK_{ES3}$	10,6±0,2

Fonte: o autor.

Com respeito aos valores de  $k^i$  e  $k^{max}$  pode-se observar que o segundo contribui cerca de 5,4 vezes a mais para a catálise em relação ao primeiro. Por sua vez, a

análise das constantes de acidez indica que o  $pK_{ES3}$  de 10,6 deve pertencer ao grupo hidroperoxila da espécie C4a-hidroperoxiflavina (Esquema 10, p. 17), que é mais eletrofílico em relação à forma aniônica, que é inativa frente ao ataque dos elétrons  $\pi$  do salicilato. Os valores de  $pK_{ES1}$  e  $pK_{ES2}$  são propostos para grupos imidazóis de resíduos de histidina presentes ou próximos do sítio ativo da NahG. A desprotonação desses resíduos leva as formas neutras (Esquema 14) que diminuem a afinidade da enzima pelo substrato aniônico, mas favorecem a catálise que deve passar pela formação de uma carga positiva, repelida por resíduos catiônicos no sítio ativo da NahG. Esses aspectos serão avaliados nas próximas seções deste trabalho.

**Esquema 14. Equilíbrio ácido-base para grupos imidazóis em resíduos de histidina.** Os valores de  $pK_{ES1}$  e  $pK_{ES2}$  sobre a seta são aqueles obtidos para reação de descaboxilação oxidativa do ácido salicílico pela NahG conforme apresentado na Tabela 6.



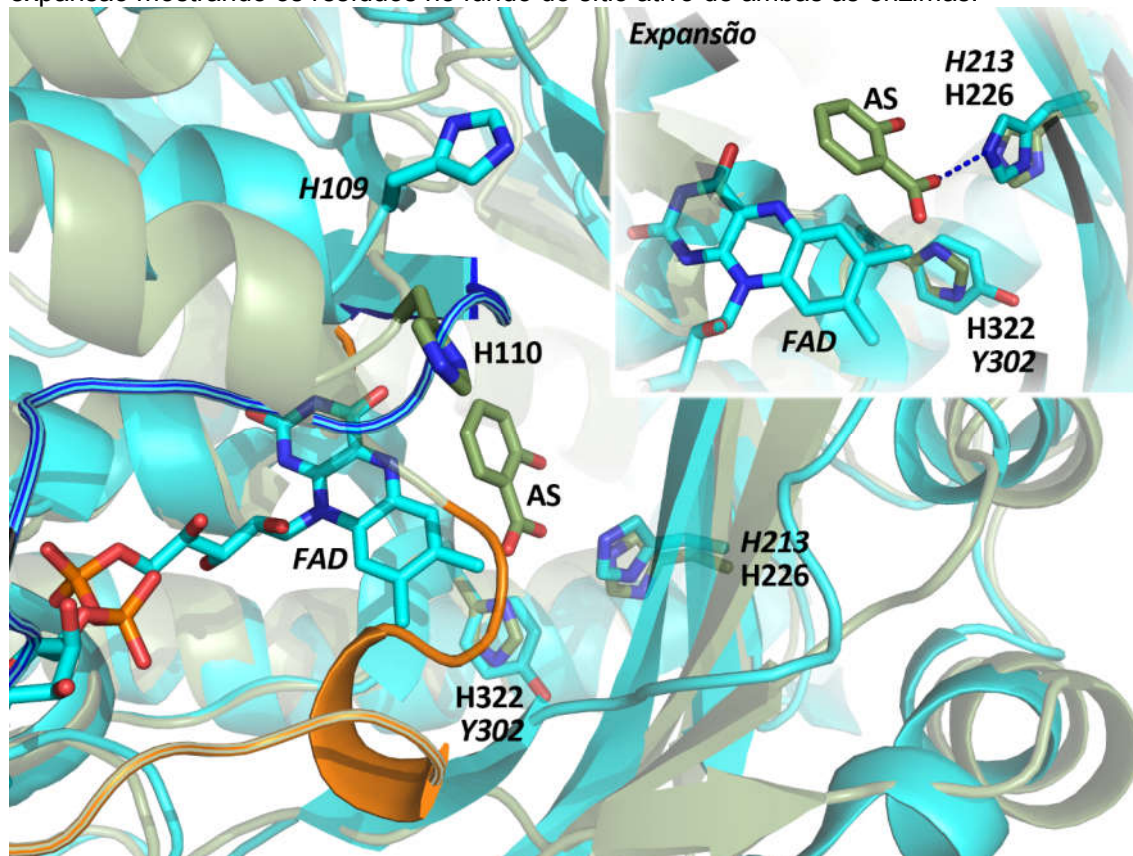
Fonte: o autor.

#### 4.3.2 Parâmetros cinéticos básicos e estudos em função do pH para as NahG mutantes H110N e H332Y

Considerando os resultados obtidos acima para a NahG nativa, a caracterização cinética foi voltada a três mutantes histidínicos: H110N, H226A e H322Y. A escolha desses resíduos baseou-se nas suas proximidades com o sítio ativo da NahG. A Figura 29 apresenta uma sobreposição da estrutura da apo 6xHis-NahG ligada ao AS e a 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) ligada ao FAD, mostrando a posição dos resíduos de histidina mutados na NahG e aqueles em posição equivalente na 3HB6H.

**Figura 29. Sobreposição de estruturas de monooxigenase flavodependentes mostrando os resíduos de histidina mutados na NahG.** A 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) com PDB ID 4BJZ está em cinza, ligada a FAD e com sua alça FAD (resíduos 34-

50) mostrada em azul. A posição desta alça difere da apo 6xHis-NahG ligada aoAS, mostrada em verde com sua alça FAD(resíduos 36-52)em laranja. No inserto está uma expansão mostrando os resíduos no fundo do sítio ativo de ambas as enzimas.



Fonte: o autor; a figura foi gerada a partir dos respectivos PDBs utilizando o programa Pymol 1.5.<sup>72</sup>

O resíduo H110, embora não seja muito conservado na família de monooxigenases flavodependentes, também está presente na 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) e próximo da alça FAD, sofrendo um forte reposicionamento com a ligação do FAD. A escolha da Asn na mutação H110N é a mais equivalente e menos drástica possível para afetar as interações da His presente na alça FAD.

O resíduo H226 está no fundo do sítio de ligação do substrato e a uma distância de aproximadamente 2,6 Å do grupo carboxilato do AS, estando presente também na 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H). A mutação H226A visa abolir completamente a função desse resíduo na catálise.

O resíduo H322 está no fundo do sítio ativo da NahG e a uma distância maior do substrato em relação à observada para H226. A mutação H322Y é ortogonal em

relação 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H) que apresenta um resíduo de tirosina na mesma posição.

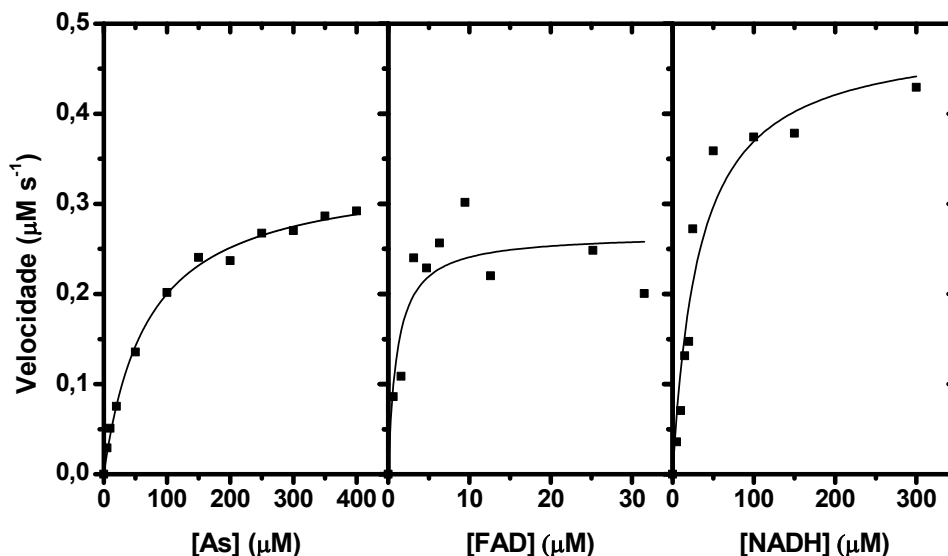
No entanto, como descrito anteriormente, o mutante H226A não expressou apropriadamente e a purificação não pode ser realizada. Nós acreditamos que a razão para a expressão dificultada de NahG H226A pode ser devida à mutação drástica que representa a substituição de um resíduo de histidina por um de alanina que, usualmente, pode causar problemas de enovelamento durante a expressão. Em contrapartida, o mutante H322Y tem sua estabilidade fortemente aumentada frente a NahG nativa. Esta quando não ligada a FAD perde sua atividade dentro de 12 horas a temperatura ambiente, sendo que a ligação do FAD, tipicamente, duplica sua estabilidade. O mutante H110N segue perfil similar. No entanto, a atividade do mutante H322Y é preservada a temperatura ambiente, e sem adição de FAD, por mais do que uma semana (dados não apresentados).

Dessa forma, todos os estudos foram conduzidos apenas com os mutantes H110N e H322Y. Para cada um desses mutantes se avaliou o efeito da concentração do AS, FAD e NADH, obtendo-se, assim, os respectivos valores de  $K_m$  e  $k_{cat}$ . A atividade enzimática também foi avaliada em função do pH. Esse conjunto de dados, em comparação aos dados com a NahG nativa, permitem avaliar a importância de cada resíduo mutado para a atividade catalítica da enzima nativa.

As Figuras 30 e 31 apresentam os dados de velocidade em função da concentração do AS, FAD e NADH para as NahG H110N e H322Y, respectivamente. Esses dados foram ajustados não-linearmente com a Equação 18 para renderem os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 8.

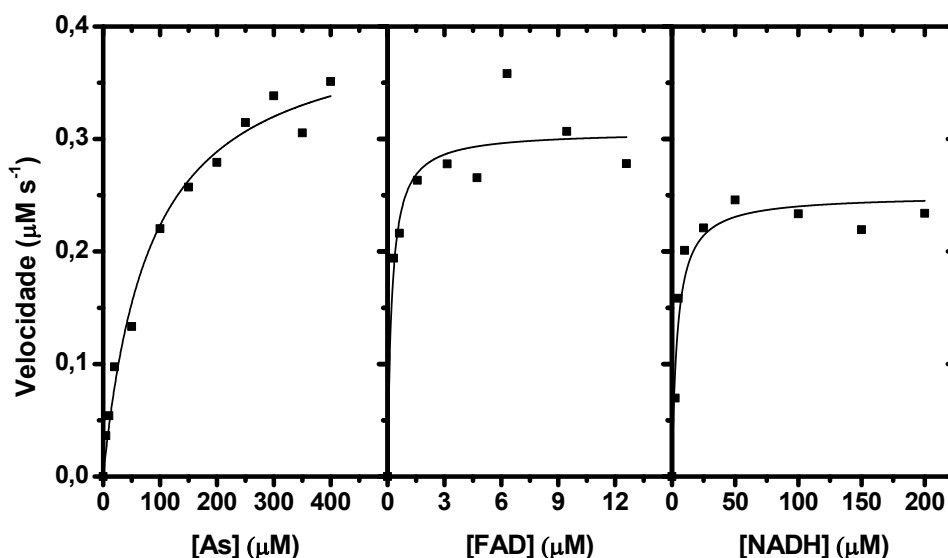
**Figura 30. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG H110N em pH 8,5 e 25 °C.** A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e os parâmetros apresentados na Tabela 8.

Dados: [NahG H110N] = 0,064 $\mu$ M; Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e *I*de 0,2 (NaCl); exceto onde a concentração foi variada, as concentrações de AS, FAD e NADH foram 192  $\mu$ M, 94,5  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, respectivamente.



Fonte: o autor.

**Figura 31. Velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico, FAD e NADH para reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pela NahG H322Y em pH 8,5 e 25 °C.**A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e os parâmetros apresentados na Tabela 8. Dados: [NahG H322Y] = 0,032 $\mu$ M; Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e *I*de 0,2 (NaCl); exceto onde a concentração foi variada, as concentrações de AS, FAD e NADH foram 192  $\mu$ M, 6,3  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, respectivamente.



Fonte: o autor.

**Tabela 8. Parâmetros cinéticos para ácido salicílico, FAD e NADH na reação de conversão de salicilato em catecol catalisada pelas NahG H110N e H322Y em pH 8,5 e 25 °C.**Os valores foram calculados segundo o modelo de Michaelis-Menten e os dados

apresentados nas Figuras 28 e 29. Os respectivos dados para a NahG nativa (Tabela 6) são apresentados para comparação.

NahG	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )			$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} / k_{\text{cat}}^{\text{nativa}}$
	AS	FAD	NADH		
nativa	30,0	1,61	39,2	0,337	1
H110N	79,0	1,08	32,4	6,91	20
H322Y	83,2	0,22	3,72	10,0	30

Fonte: o autor.

Conforme se pode observar na Tabela 8, os valores de  $K_m$  para AS nos mutantes H110N e H322Y são cerca de 2,7 vezes mais elevados do que o observado para a enzima nativa. Convém lembrar que este parâmetro indica a afinidade do substrato pela enzima. Assim, as mutações dos resíduos de histidina causam uma diminuição da constante de ligação do AS. Esses resíduos devem formar um ambiente catiônico no sítio ativo da NahG, que auxilia na ligação do AS na sua forma aniônica. Esse efeito segue o observado para o perfil de  $K_m$  em função do pH para a enzima nativa, onde os valores de  $K_m$  são menores em meios mais ácidos. A diminuição dos valores de  $K_m$  segue um perfil sigmoidal (Figura 28) conforme a protonação dos grupos imidazóis dos resíduos de histidina alcança seu máximo.

O valor de  $K_m$  para FAD praticamente não altera coma mutação H110N e diminui cerca de 7 vezes para H322Y em relação a NahG nativa. Este efeito é intrigante visto que longe do FAD a H322 deveria ter um efeito muito pequeno na NahG nativa.

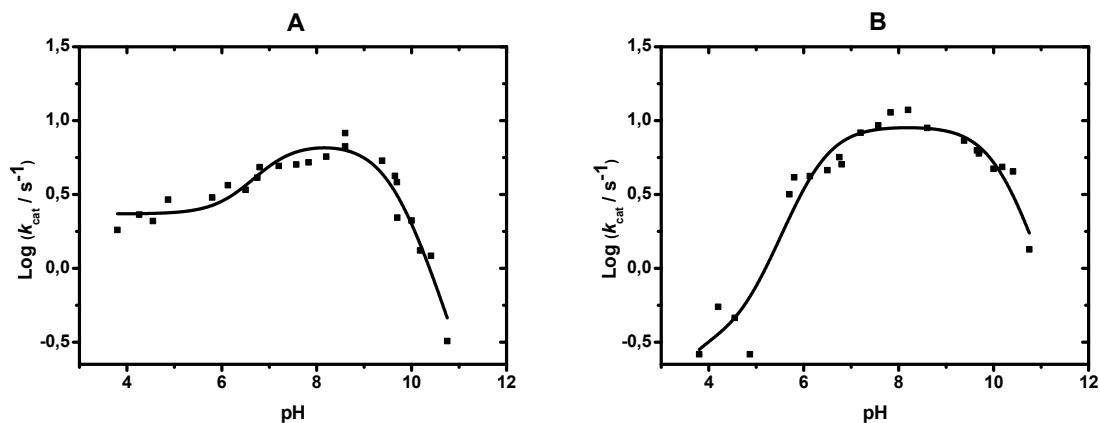
Os efeitos sobre os valores de  $K_m$  para NADH dos mutantes são mais evidentes em relação a NahG nativa. Um aumento de cerca de 8,7 vezes é observado para o mutante H110N, que está próximo da alça FAD e do local de ligação do NADH. Assim, se pode presumir desse dado que este resíduo participa diretamente da ligação do NADH. O efeito para o mutante H322Y é uma diminuição no valor de  $K_m$  de cerca de 10 vezes em relação a NahG nativa. Novamente, este resíduo está longe do local de ligação do NADH e podemos apenas propor que este

deve participar de eventos dinâmicos e cinéticos que serão discutidos adiante. A insuficiência de dados em relação a esse mutante nos impede de conclusões mais adequadas e estudos futuros serão necessários.

Os valores de  $k_{cat}$  aumentam, em relação a enzima nativa, cerca de 20 e 30 vezes para os mutantes H110N e H322Y, respectivamente. Isso pode indicar que grupos carregados positivamente no sítio ativo devem desfavorecer a reação, que deve passar por um estado de transição com diminuição ou dispersão de densidade eletrônica. Relativo à mutação H322Y em NahG, da qual parte a premissa deste trabalho de mutação ortogonal em relação a 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase (3HB6H), é interessante notar que o valor de  $k_{cat}$  para a 3HB6H é  $6,49 \text{ s}^{-1}$  na reação de *para*-hidroxilação do 3-hidroxibenzoato para formar 2,5-dihidroxibenzoato.<sup>27</sup>

A Figura 32 apresenta os perfis de  $\text{Log}(k_{cat})$  como uma função do pH para os mutantes H110N e H322Y da NahG. As curvas teóricas foram obtidas pelo ajuste teórico com a Equação 20 e os parâmetros cinéticos e de equilíbrio mostrados na Tabela 9. Convém mencionar que  $\text{p}K_{ES1}$  não foi considerado na obtenção da curva teórica para o mutante H110N. A Figura 33 apresenta apenas os ajustes teóricos para fins de comparação entre a NahG nativa e mutantes.

**Figura 32. Efeito do pH sobre  $\text{Log}(k_{cat})$  para a reação de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pelas NahG H110N (A) e H322Y (B) a 25 °C.** As linhas sólidas representam o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação 20 e os parâmetros apresentados na Tabela 9. Dados:  $[\text{FAD}] = 94,5 \mu\text{M}$  (H110N) e  $6,3 \mu\text{M}$  (H322Y), e  $[\text{NADH}] = 100 \mu\text{M}$ ; Tampões 50 mM contendo 1,0 mM EDTA e  $I$  de 0,2 (NaCl).



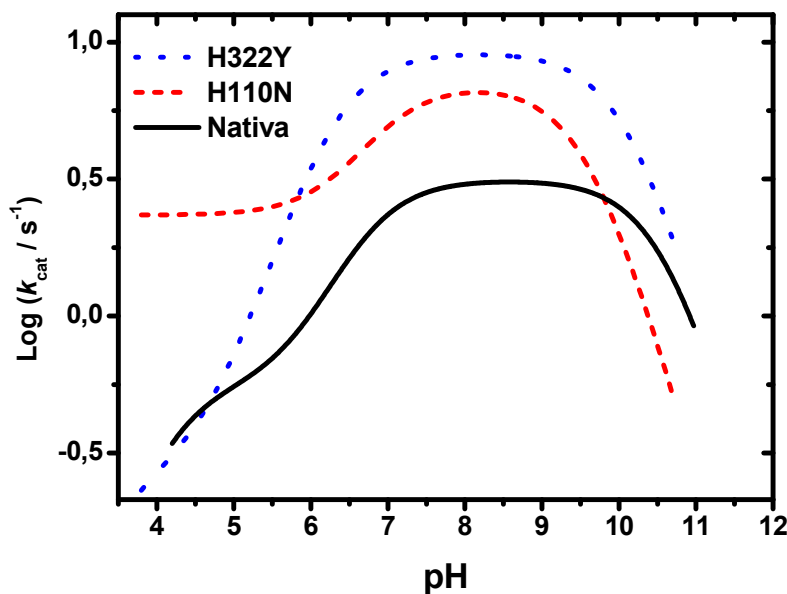
Fonte: o autor.

**Tabela 9. Parâmetros cinéticos e de equilíbrio para a reação de descaboxilação oxidativa de ácido salicílico pelas NahG H110N e H322Y a 25,0 °C.** Os parâmetros foram obtidos pelos ajustes não-lineares (linhas sólidas) dos dados na Figura 32 utilizando a Eq. 20. Os respectivos dados para a NahG nativa (Tabela 7) são apresentados para comparação. O valor de  $pK_{ES1}$  para H110N foi desconsiderado no ajuste (*vide texto*).

Parâmetros	NahG		
	nativa	H110N	H322Y
$k^i (s^{-1})$	0,59±0,08	2,30 ±0,02	0,32 ± 0,07
$k^{max} (s^{-1})$	3,2±0,2	7,0 ± 0,2	9,2 ± 0,6
$pK_{ES1}$	4,2	-	3,2
$pK_{ES2}$	6,7	6,9	6,3
$pK_{ES3}$	10,6	9,6	10,1

Fonte: o autor.

**Figura 33. Comparação do pH sobre  $\text{Log}(k_{cat})$  para as reações de descarboxilação oxidativa do AS catalisada pelas NahG nativa e mutantes a 25 °C.** Apenas as linhas sólidas obtidas dos ajustes não lineares nas Figuras 27 e 32 são mostrados: nativa em preto sólido; H110N em vermelho tracejado; H322Y em azul pontuado.



Fonte: o autor.

Ambas as NahG mutantes apresentam valores de atividade mais elevada do que observada para a enzima nativa (Figura 33) na ordem H322Y > H110N > nativa. A NahG H110N apresenta um perfil em forma de sino que converge para um platô no lado ácido. Os dados experimentais concordam com um modelo cinético (Esquema 13 e Equação 20) em que  $pK_{ES1}$  está ausente. Assim, se presume que tal constante de acidez na enzima nativa seja referente ao resíduo de H110. Por sua vez, enquanto que uma diminuição de uma unidade de  $pK_a$  é observada para  $pK_{ES3}$ , atribuído ao grupo hidropoxila da espécie C4a-hidropoxiflavina, o  $pK_{ES2}$  permanece praticamente inalterado com a mutação. Aumentos de cerca de 2 e 4 vezes são observados para  $k^{max}$  e  $k^i$ , respectivamente, que mostram que a isoforma  $ES_{AH_2}$  no mutante H110N é relativamente mais ativa que na enzima nativa. Na busca por interpretar esse efeito, ainda que no campo das hipóteses, somos tentados a propor que a relação de atividade entre cada isoforma responsável por  $k^{max}$  e  $k^i$  esteja associada a eventos dinâmicos. O resíduo H110 próximo a alça FAD pode participar do processo dinâmico de redução do FAD pelo NADH ou de qualquer outro processo dinâmico parcialmente determinante da velocidade reacional. No entanto, experimentos futuros precisam ser realizados para avaliar esse ponto.

No mutante H322Y, os valores de  $pK_{ES2}$  e  $pK_{ES3}$  são similares ao observado para a enzima nativa, bem como o valor de  $k^i$  é pouco afetado pela mutação. O valor de  $k^{max}$ , por sua vez, é cerca de 3 vezes mais alto, no que se pode inferir da ausência de um resíduo carregado positivamente no sítio ativo. É interessante notar que esse resíduo está próximo (Figura 29) da H226, que deve participar diretamente da descarboxilação e à qual atribuímos o valor de  $pK_{ES2}$  de 6,7 na enzima nativa. A razão dessa atribuição deve-se ao fato que esse  $pK_a$  é pouco afetado nos dois mutantes no que tange ao único resíduo histidínico que, ainda, precisa de estudos cinéticos mais detalhados. Os estudos a frente estão em concordância com essa atribuição, mas estudos cinéticos futuros com mutantes de H226 são importantes para confirmar esse ponto.

### 4.3.3 Avaliação da demanda eletrônica na catálise da NahG nativa

A análise da demanda eletrônica em uma reação oferece várias informações com relação ao mecanismo reacional. Uma forma de realizar isso experimentalmente é produzir mudanças estruturais discretas no substrato que aumentam ou diminuem a densidade eletrônica nos centros eletrofílicos ou nucleofílicos. Nesta parte do trabalho isto é alcançado pela análise dos dados cinéticos de ácidos salicílicos substituídos com grupos elétron doadores e retiradores nas posições 4 e 5 (Figura 4, p. 19). De modo a prover uma análise global e quantitativa desses efeitos, o uso de Relações Lineares de Energia Livre (RLEL) é uma ferramenta poderosa, mesmo para sistemas complexos como enzimas. Para uma leitura mais detalhada do exposto abaixo sugere-se a leitura da literatura adequada.<sup>55</sup>

Como guia para análise dos resultados a frente, a seguir são apresentados alguns conceitos teóricos referentes a RLEL de Hammett. Basicamente, no que tange a este trabalho, a equação de Hammett (Equação 21) é uma função linear:

$$\log k_{cat}^R = \sigma \rho + \log k_{cat}^H \quad (\text{Eq. 21})$$

onde,  $\log k_{cat}^R$  e  $\log k_{cat}^H$  são na sua ordem os logaritmos das constantes catalíticas dos ácidos salicílicos substituídos e não substituído, e  $\rho$  (rhô) é o coeficiente angular que mede o quão sensível é  $\log k_{cat}^R$  em relação a sigma ( $\sigma$ ).

O valor de  $\sigma$  é característico para cada grupo substituinte no ácido salicílico, sendo obtido, convenientemente, a partir da ionização de ácidos benzoicos substituídos conforme a equação abaixo:

$$\sigma = \frac{pK_a^H - pK_a^R}{\rho} \quad (\text{Eq. 22})$$

onde,  $pK_a^R$  e  $pK_a^H$  são as constantes de ionização dos ácidos benzoicos substituídos e não substituído ( $R = H$ ). Assim, o valor de  $\sigma$  para o composto não substituído é igual a zero. Os grupos elétron retiradores diminuem o valor de  $pK_a$  de ácidos benzoicos tornando-os mais ácidos, de modo que os valores de  $\sigma$ , nesses casos, são positivos, do contrário, valores de  $\sigma$  negativos são encontrados para grupos elétron doadores.

Visto que a relação de Hammett é uma relação direta do efeito de substituintes no equilíbrio ácido-base de ácidos benzoicos e na reatividade dos ácidos salicílicos,

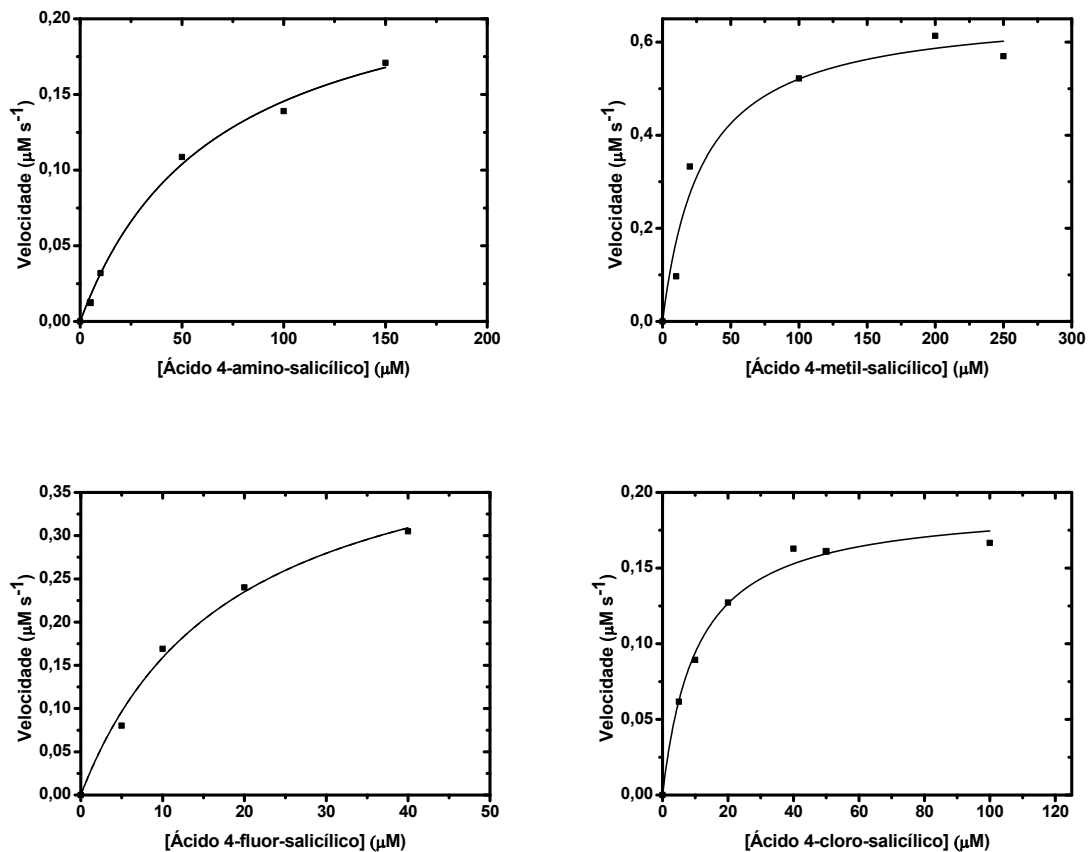
pode-se assumir que a mudança na energia de ativação,  $\Delta G^\ddagger$ , causada pela substituição é diretamente proporcional às mudanças de  $\Delta G^\circ$ . Essa relação permite quantificar os efeitos de grupos doadores e retiradores de elétrons em intermediários e no estado de transição até a etapa determinante de velocidade de reação. Neste caso, o efeito pode ser quantificado por  $\rho$  para se definir as características do estado de transição.

Os valores de  $\rho$  positivos indicam que a reação é favorecida por grupos elétron doadores que estabilizam uma deficiência eletrônica na direção do estado de transição ou aumentam a nucleofilicidade de um molécula reagente substituída. Os valores de  $\rho$  negativos indicam que grupos elétron retiradores desestabilizam o estado reagente, aumentando sua eletrofilicidade, ou auxiliam na diminuição da energia pela estabilização de um estado de transição em que houve formação de carga negativa. A magnitude desses valores indica o grau de mudança da densidade eletrônica do estado reagente ao estado de transição. Além disso, mudanças na linearidade indicam a contribuição de diferentes reações em que os grupos substituintes têm um efeito diferente sobre cada reação, o que pode causar uma mudança da etapa determinante de velocidade reacional.

É importante observar que  $\sigma$  é, usualmente, válido apenas para substituintes nas posições *meta* e *para*, que não apresentam os efeitos estéricos ocasionados por substituintes na posição *orto*. Além disso, é um parâmetro que não considera a conjugação direta da carga (parcial ou total) no reagente ou no estado de transição com o substituinte. Nestes casos, sistemas em que há a conjugação de uma carga negativa utiliza-se o parâmetro  $\sigma^-$ , calculado da ionização de fenóis, enquanto que naqueles em que há a conjugação de uma carga positiva utiliza-se o parâmetro  $\sigma^+$ , obtido da solvólise de cloretos de *terc*-cumila substituídos.

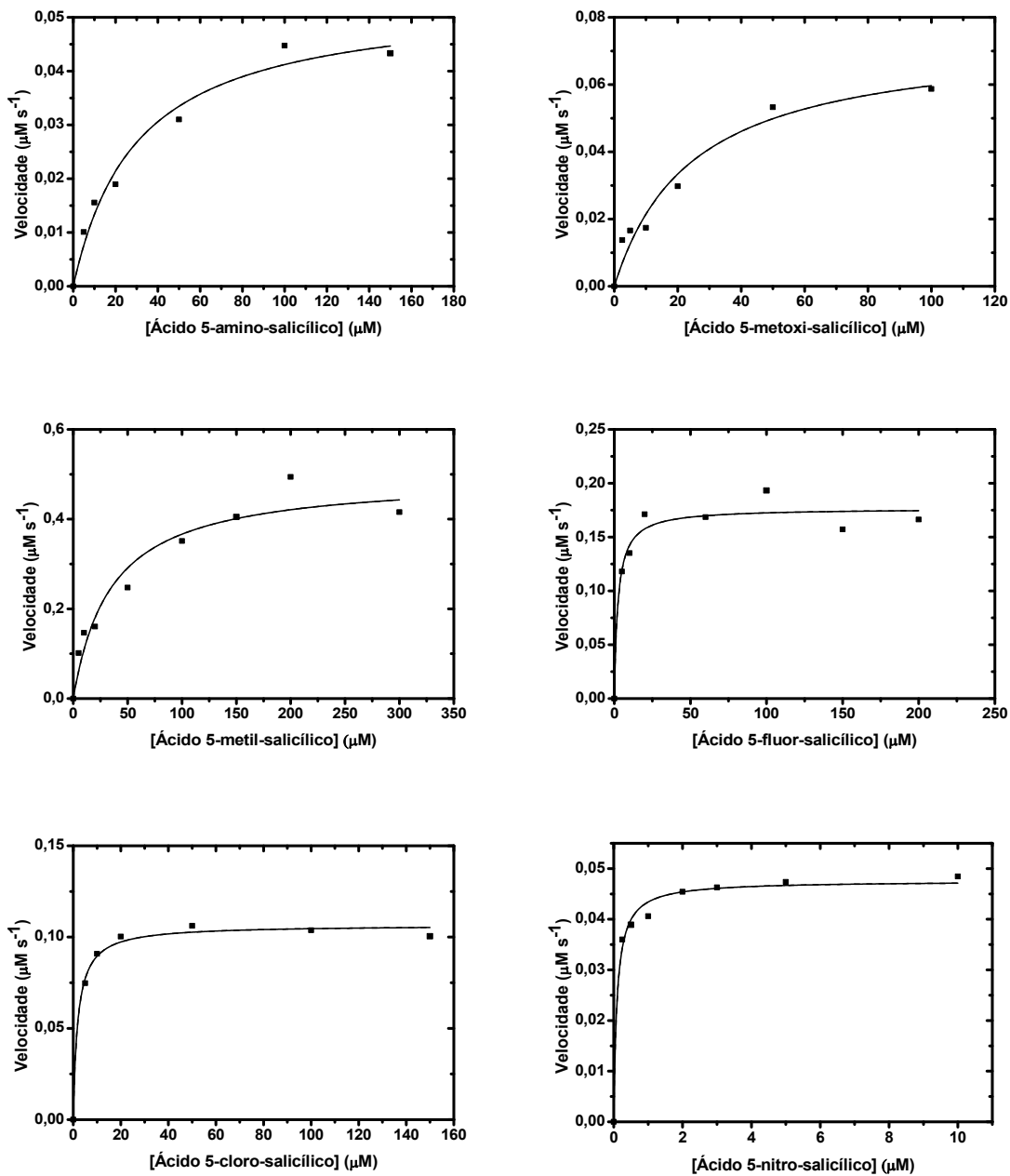
As Figuras 34 e 35 apresentam os dados de velocidade em função da concentração de substrato para a descarboxilação de ácidos salicílicos substituídos nas posições 4 e 5 catalisada pela enzima NahG nativa ao custo de NADH. Os ajustes teóricos seguindo o modelo de Michaelis-Menten geraram os parâmetros apresentados nas Tabelas 10 e 11.

**Figura 34. Velocidade de reação em função da concentração de ácidos salicílicos substituídos na posição 4 para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C. A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e os parâmetros apresentados na Tabela 10. Dados: [NahG] = *vide* Tabela 10; [NADH] = 200  $\mu\text{M}$ , [FAD] = 31,5  $\mu\text{M}$ , Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e *I*de 0,2 (NaCl).**



Fonte: o autor.

**Figura 35. Velocidade de reação em função da concentração de ácidos salicílicos substituídos na posição 5 para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.** A linha sólida representa o ajuste não linear dos dados cinéticos utilizando a Equação de Michaelis-Menten e os parâmetros apresentados na Tabela 11. Dados: [NahG] = *vide* Tabela 11; [NADH] = 200  $\mu\text{M}$ , [FAD] = 31,5  $\mu\text{M}$ , Tampão 50 mM HEPES, 1,0 mM EDTA e *I*de 0,2 (NaCl).



Fonte: o autor.

**Tabela 10. Parâmetros cinéticos para os ácidos salicílicos substituídos na posição 4, para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.** Os valores foram calculados segundo o modelo de Michaelis-Menten e os dados apresentados na Figura 33.

Substituinten a posição 4	[NahG] ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\sigma_p$	$\sigma_m$	$\sigma_p^+$	$\sigma_p^-$
NH <sub>2</sub>	0,192	76,73	0,24	1,26	-0,66	-0,16	-1,3	-0,15
CH <sub>3</sub>	0,192	29,04	0,67	3,50	-0,17	-0,07	-0,31	-0,17
H	0,064	40,75	0,20	3,15	0	0	0	0
F	0,192	18,36	0,45	2,35	0,06	0,34	-0,07	-0,03
Cl	0,192	10,47	0,19	1,00	0,23	0,37	0,11	0,19

Fonte: o autor.

**Tabela 11. Parâmetros cinéticos para os ácidos salicílicos substituídos na posição 5, para a reação de descarboxilação oxidativa catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C.** Os valores foram calculados segundo o modelo de Michaelis-Menten e os dados apresentados na Figura 34.

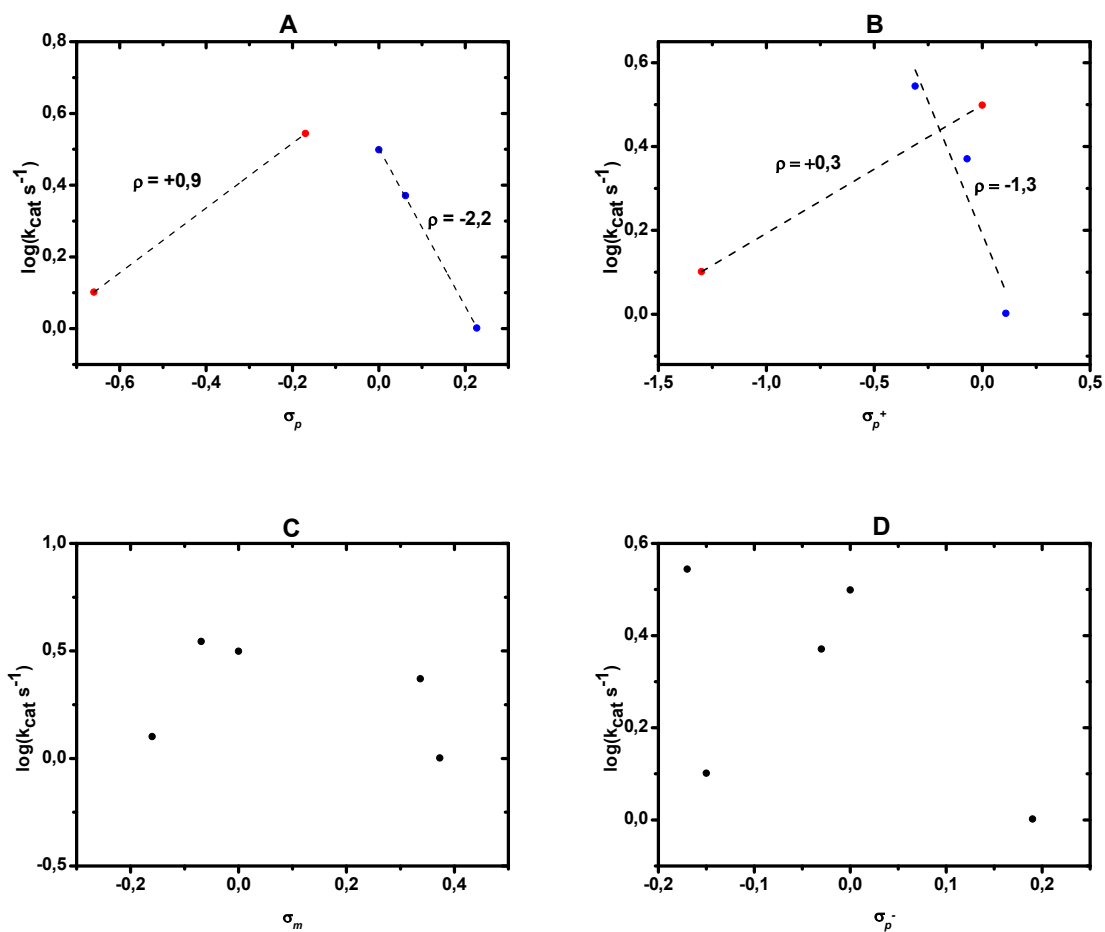
Substituinte na posição 5	[NahG] ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\sigma_p$	$\sigma_m$	$\sigma_p^+$	$\sigma_p^-$
NH <sub>2</sub>	0,192	30,17	0,05	0,28	-0,66	-0,16	-1,3	-0,15
OCH <sub>3</sub>	0,192	24,55	0,07	0,39	-0,27	0,12	-0,78	-0,26
CH <sub>3</sub>	0,192	33,38	0,50	2,58	-0,17	-0,07	-0,31	-0,17
H	0,064	40,75	0,20	3,15	0	0	0	0
F	0,192	2,41	0,18	0,92	0,06	0,34	-0,07	-0,03
Cl	0,192	1,91	0,11	0,56	0,23	0,37	0,11	0,19
NO <sub>2</sub>	0,640	0,10	0,05	0,07	0,78	0,72	0,79	1,24

Fonte: o autor.

Conforme observado nas Tabelas 10 e 11, há uma diminuição dos valores de  $K_m$  na direção de grupos retiradores de elétrons, como se pode presumir do fato da diminuição da basicidade do substrato que deve afetar sua capacidade de ligação no sítio ativo. Basicamente, grupos retiradores de elétrons dispersam a densidade eletrônica sobre o grupo carboxilato que deve participar de interações de natureza iônica com resíduos protonado de histidina, presentes no sítio ativo da NahG. De fato, conforme observado na Figura 29, o grupo carboxilato do ácido salicílico está em proximidade para interagir com o resíduo His226.

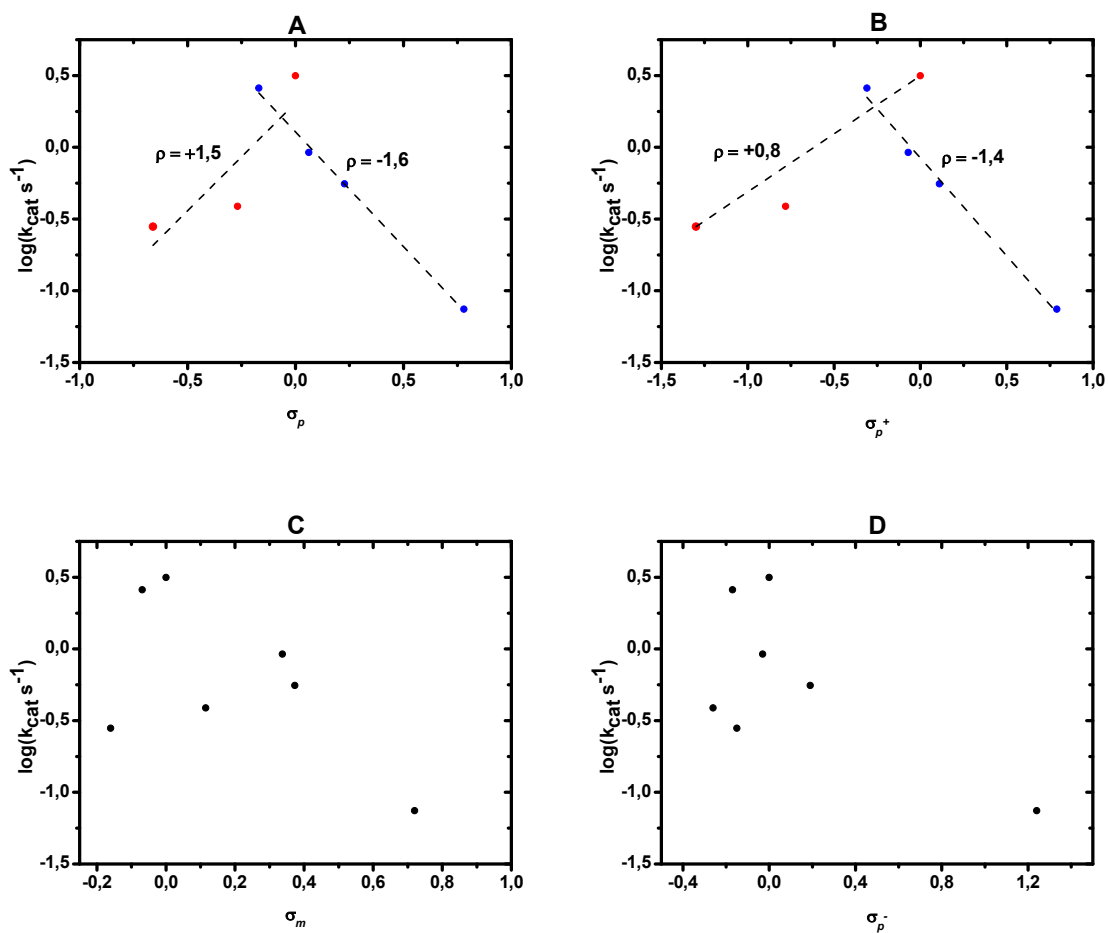
A Figura 36 e 37 apresentam os dados de  $\text{Log } k_{\text{cat}}$  em função dos parâmetros de Hammett  $\sigma_p$ ,  $\sigma_m$ ,  $\sigma_p^+$  e  $\sigma_p^-$  para os ácidos salicílicos substituídos nas posições 4 e 5, respectivamente. Em ambos os casos, observa-se um perfil curvo para  $\sigma_p$  e  $\sigma_p^+$  e nenhuma correlação aparente para  $\sigma_m$  e  $\sigma_p^-$ . Isso indica que as reações são dependentes de substituintes na posição *para* em relação ao grupo carboxilato (ácidos salicílicos substituídos nas posições 4) e hidroxila (ácidos salicílicos substituídos nas posições 5) e dependentes de uma carga positiva formada no estado de transição ou intermediário; a relação dos dados com a constante  $\sigma^+$  indica, em geral, a geração de uma carga positiva nesses estados. O formato curvo é característico de mudança de etapa determinante da velocidade em uma reação que ocorre em pelos menos duas etapas, sendo que os grupos retiradores ou doadores de elétrons tem influência diferente sobre cada etapa. Baseado, nestas observações o mecanismo a seguir foi proposto. As duas etapas de interesse para a análise dos gráficos de Hammett (Figuras 36 e 37) são relacionadas ao ataque do salicilato sobre o átomo de oxigênio do grupo hidroperoxila da espécie C4a-hidroperoxiflavina (etapa de ataque) e a reação de descarboxilação do intermediário tipo Wheland (etapa de descarboxilação), conforme representado no Esquema 15.

**Figura 36. Log  $k_{\text{cat}}$  em função dos parâmetros de Hammett para a reação de descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos na posição 4 catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C. As linhas tracejadas representam ajustes lineares segundo a Equação 21, o coeficiente angular  $\rho$  estão indicados próximos a cada ajuste. Os dados individuais estão indicados nas Tabelas 10.**



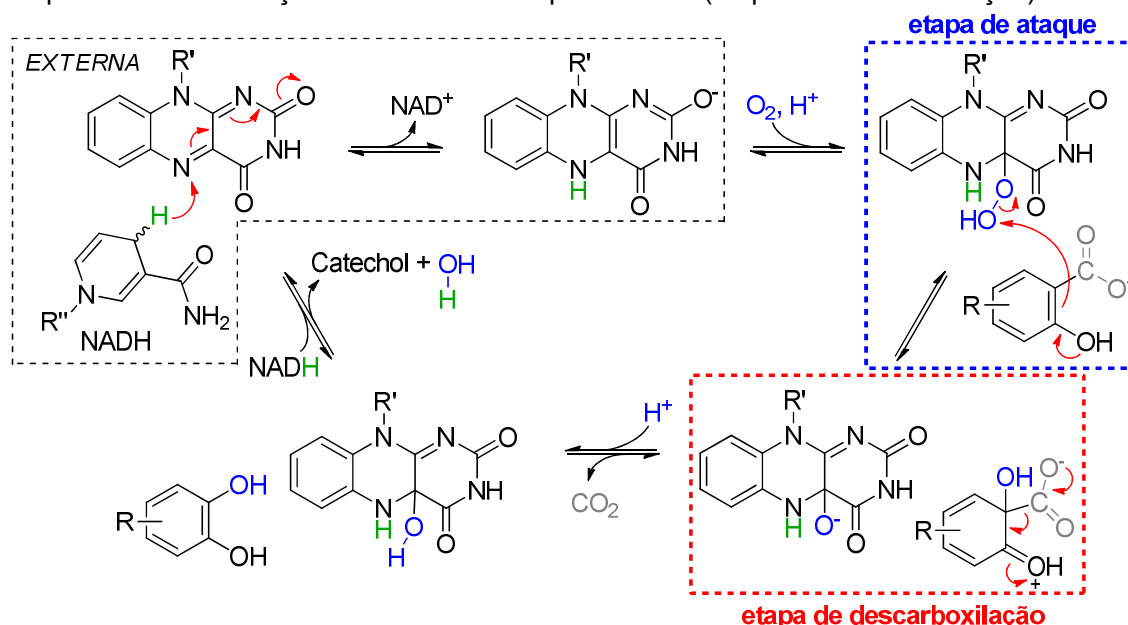
Fonte: o autor.

Figura 37. Log  $k_{\text{cat}}$  em função dos parâmetros de Hammett para a reação de descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos na posição 5 catalisada pela NahG em pH 8,5 e 25 °C. As linhas tracejadas representam ajustes lineares segundo a Equação 21, o coeficiente angular  $\rho$  estão indicados próximos a cada ajuste. Os dados individuais estão indicados nas Tabelas 11.



Fonte: o autor.

**Esquema 15. Mecanismo proposto para a catálise da enzima NahG sobre a descarboxilação de ácidos salicílicos substituídos.** O quadro tracejado em azul indica a etapa de ataque o ácido salicílico sobre o átomo de oxigênio do grupo hidropoxila da espécie C4a-hidroperoxiflavina (etapa de ataque) e o quadro tracejado em vermelho indica a etapa de descarboxilação do intermediário tipo Wheland (etapa de descarboxilação).



Fonte: o autor.

Sob a ótica apresentada no Esquema 15, os dados das Figuras 36 e 37 mostram que grupo doadores de elétrons favorecem a etapa de ataque, aumentando a nucleofilicidade do anel aromático do salicilato, e desfavorecem a etapa de descarboxilação por dificultar a aromatização na direção do produto catecol. Por sua vez, grupos retiradores de elétrons, de modo oposto ao dos substituintes doadores, favorecem a etapa de descarboxilação e desfavorecem a etapa de ataque. O cruzamento entre os coeficientes angulares representados por  $\rho$  referem ao substituinte que apresenta constantes de velocidade iguais para ambas às etapas.

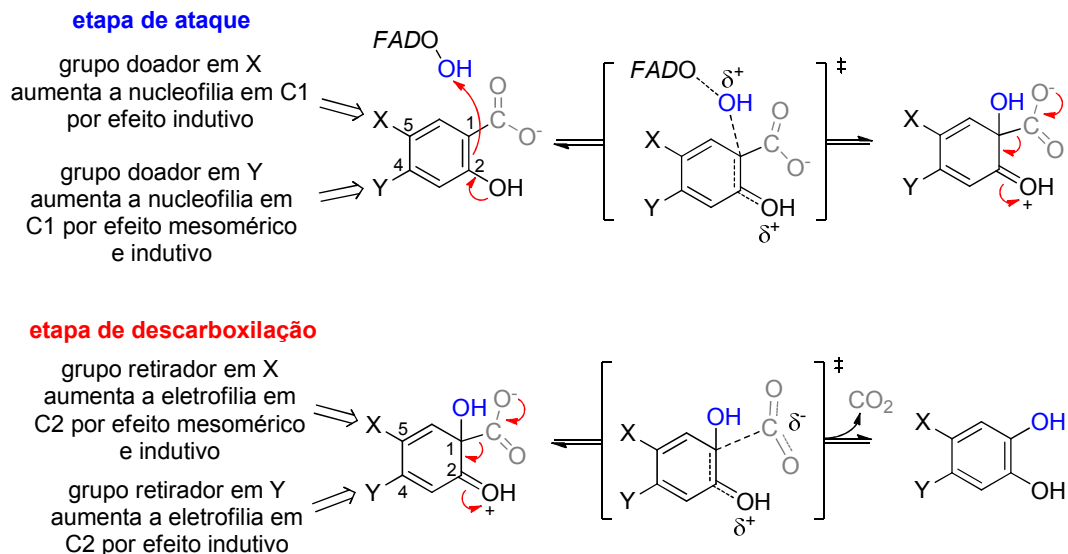
Os valores de  $\rho$  negativos referem à etapa de ataque, tendo como referência os valores obtidos como  $\sigma_p$ , o valor de  $\rho = -2,2$  (posição 4) em relação ao valor de  $\rho = -1,6$  (posição 5) indicam que grupos na posição *para* em relação ao grupo carboxila

têm um efeito mais pronunciado do que grupos na posição *meta*. Isso pode ser explicado baseado no fato que grupos na posição *para* realizam ressonância direta com o carbono nucleofílico do anel na etapa de ataque, enquanto que grupos na posição *meta* apresentam apenas efeito indutivo sobre esse carbono (Esquema 16).

Agora, tendo como referência os valores obtidos com  $\sigma_p^+$ , o valor de  $\rho = -1,3$  (posição 4) em relação ao valor de  $\rho = -1,4$  (posição 5), embora mostrem uma diferença pequena, indicam que grupos doadores de elétrons na posição *para* em relação ao grupo fenol estabilizam a carga positiva formada sobre o seu átomo de oxigênio no estado de transição.

Os valores de  $\rho$  positivos referem à etapa de descarboxilação, considerando os valores obtidos com  $\sigma_p$ , o valor de  $\rho = +0,9$  (posição 4) em relação ao valor de  $\rho = +1,5$  (posição 5) indicam que grupos na posição *para* em relação ao grupo fenol têm um efeito mais pronunciado do que grupos na posição *meta*. Isso pode ser explicado baseado no fato que grupos retiradores de elétrons na posição *para* realizam ressonância direta com os carbonos adjacentes ao carbono ligado ao grupo carboxila, enquanto que grupos na posição *meta* apresentam apenas efeito indutivo sobre esses carbonos. Os valores de  $\rho$  obtidos com  $\sigma_p^+$  apresentam comportamento similar a  $\sigma_p$  indicando que uma carga positiva está desenvolvida no intermediário tipo Wheland ou no estado de transição que leva ao produto (Esquema 16).

**Esquema 16. Efeito de substituintes na descarboxilação oxidativa de ácidos salicílicos substituídos.** No topo está representada a etapa de ataque do ácido salicílico sobre o átomo de oxigênio do grupo hidropoxila da espécie C4a-hidroperoxiflavina (etapa de ataque) e abaixo esta a etapa de descarboxilação do intermediário tipo Wheland (etapa de descarboxilação).



Fonte: o autor.

## 5 CONCLUSÃO

Na busca pela caracterização da enzima salicilato hidroxilase (NahG) de *Pseudomonas putida* cepa G7 em relação a sua dinâmica proteica e seu mecanismo de catálise chegou-se às seguintes conclusões:

i. Na análise dos dados estruturais obtidos pela técnica de espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) observou-se que o raio de giro ( $R_g$ ) sofreu uma diminuição com a ligação do cofator FAD na apo NahG, indicando que a apoenzima sofre uma contração estrutural em relação a holoenzima. Propomos que as mudanças estruturais causadas pela ligação do FAD não ocorrem unicamente em uma pequena região da proteína, mas envolvem regiões mais afastadas do sítio de ligação do FAD. Essa dinâmica depende de resíduos conservados próximos ao sítio de ligação com o FAD (E38, D314 e R111), presentes em uma região distal em relação a sua alça de ligação (resíduos 36-52). Embora, a influência de eventos dinâmicos para a ação enzimática deve ainda ser estabelecida por estudos futuros, sugere-se a sua importância para catálise;

ii. A análise dos dados obtidos por titulação fluorimétrica mostrou que a ligação do FAD foi seguida por uma forte supressão da fluorescência em 340 nm, que refere aos resíduos de triptofano da NahG. Isso foi acompanhado por um aumento do rendimento quântico em 524 nm, que refere à emissão do FAD, sugerindo que resíduos de triptofano sofrem uma mudança de meio e próximos ao FAD produziram transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET);

iii. Na determinação de parâmetros cinéticos básicos sobre a NahG observou-se que o valor de  $K_m$  para FAD foi comparável a  $1/K_{SV}$  determinada por espectrofluorimetria, indicando que a enzima o liga fortemente tal qual observado para outras oxigenases flavodependentes. O valor de  $K_m$  para  $O_2$  foi também extremamente baixo como consequência do fato que a reação entre  $O_2$  e flavina para formar o complexo C4a-hidroperoxiflavina ser altamente favorável. Por outro lado, o valor de  $K_m$  para NADH e ácido salicílico são relativamente mais elevados indicando uma afinidade mais baixa. No caso do ácido salicílico, o valor de  $K_m$  foi cerca de 30 vezes mais elevado que a  $K_d$  determinada por espectrofluorimetria. Dessa forma, tendo em conta o baixo valor de  $K_m$  para  $O_2$ , tem-se em conta que a etapa determinante de velocidade de reação deve ser posterior a qualquer evento de formação da C4a-hidroperoxiflavina e de ligação do AS;

iv. Na análise dos dados cinéticos em função do pH para as enzimas nativas e mutantes H110N e H322Y observou-se que duas isoformas catalisam a reação de descarboxilação oxidativa do ácido salicílico na NahG. Os perfis de  $\text{Log } k_{\text{cat}}$  em função do pH mostram três constantes de ionização, duas dessas constantes foram atribuídas a H110 ( $\text{p}K_{\text{a}} = 4,2$ ) e ao grupo peroxila da C4a-hidroperoxiflavina ( $\text{p}K_{\text{a}} = 10,6$ ), e outra é sugerida a H226 ( $\text{p}K_{\text{a}} 6,7$ ). Também se observou que os valores de  $K_{\text{m}}$  aumentam com a atividade da enzima, sugerindo que a desprotonação ou mutação dos resíduos de histidina favorece a catálise, mas diminuem a afinidade da NahG pelo AS;

v. Os estudos cinéticos com NahG nativa utilizando como substratos os ácidos salicílicos substituídos mostraram um formato curvo para o perfil de Hammett com  $\text{Log } k_{\text{cat}}$ . Isso indicou mudança da etapa determinante da velocidade de reação, que deve ocorrer em pelos menos duas etapas: 1. favorecida por grupo doadores de elétrons, envolvendo o ataque nucleofílico átomo C1 do salicilato sobre o átomo de oxigênio do grupo hidroperoxila da espécie C4a-hidroperoxiflavina formando um intermediário tipo Wheland; 2. favorecida por grupos retiradores de elétrons, o intermediário formado da reação anterior sofre descarboxilação para formar catecol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herron, J. D., What is oxidation? *Journal of Chemical Education* **1975**,52 (1), 51.
2. Hayaishi, O., *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Elsevier Science: 2012.
3. Ceresana Market Study: Ethylene. <http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/ethylene/> (accessed 24/09/2015).
4. Schmidt, R. J., Industrial catalytic processes phenol production. *Applied Catalysis A: General* **2005**,280 (1), 89-103.
5. Weber, M.; Weber, M.; Kleine-Boymann, M., Phenol. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2004**.
6. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry, Fifth Edition*. New York: W. H. Freeman, 2002.
7. Torres Pazmiño, D. E.; Dudek, H. M.; Fraaije, M. W., Baeyer–Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**,14 (2), 138-144.
8. Bioinformatics, S. S. I. o. ENZYME Enzyme nomenclature database. <http://enzyme.expasy.org/> (acessado em 24/09/2015).
9. Bugg, T. D., Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* **2003**,59 (36), 7075-7101.
10. Hayaishi, O., Oxygenases. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Lane, W. J. L. D., Ed. Academic Press: Waltham, 2013; pp 371-374.
11. Sligar, S. G.; Makris, T. M.; Denisov, I. G., Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: peroxo-heme intermediates—the central bus station in heme oxygenase catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**,338 (1), 346-354.
12. Hayaishi, O.; Katagiri, M.; Rothberg, S., Mechanism of the pyrocatechase reaction. *Journal of the American Chemical Society* **1955**,77 (20), 5450-5451.
13. Hayaishi, O., An odyssey with oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**,338 (1), 2-6.
14. Baas, B.-J.; Poddar, H.; Geertsema, E. M.; Rozeboom, H. J.; de Vries, M. P.; Permentier, H. P.; Thunnissen, A.-M. W.; Poelarends, G. J., Functional and structural characterization of an unusual cofactor-independent oxygenase. *Biochemistry* **2015**,54 (5), 1219-1232.
15. Bugg, T. D., How to break the rules of dioxygen activation. *Chemistry & Biology* **2014**,21 (2), 168-169.
16. Bugg, T. D., Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O<sub>2</sub> activation. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**,5 (5), 550-555.
17. Van Berkel, W.; Kamerbeek, N.; Fraaije, M., Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of biotechnology* **2006**,124 (4), 670-689.

18. Pazmino, D. T.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M., Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology* **2010**, *146* (1), 9-24.
19. Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (6), 2253-2278.
20. Klinman, J. P., The copper-enzyme family of dopamine  $\beta$ -monooxygenase and peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase: Resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (6), 3013-3016.
21. Valentine, A. M.; Stahl, S. S.; Lippard, S. J., Mechanistic studies of the reaction of reduced methane monooxygenase hydroxylase with dioxygen and substrates. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (16), 3876-3887.
22. Huijbers, M. M.; Montersino, S.; Westphal, A. H.; Tischler, D.; van Berkel, W. J., Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2014**, *544*, 2-17.
23. Nelson, D.; Cox, M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
24. Kemal, C.; Chan, T.; Bruice, T., Reaction of O<sub>2</sub> with dihydroflavins. 1,5-Dimethyl-1,5-dihydroalumiflavin and 1,5-dihydroisalloxazines. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (22), 7272-7286.
25. Maeda-Yorita, K.; Massey, V., On the reaction mechanism of phenol hydroxylase. New information obtained by correlation of fluorescence and absorbance stopped flow studies. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (6), 4134-4144.
26. Entsch, B.; Ballou, D.; Massey, V., Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **1976**, *251* (9), 2550-2563.
27. Sucharitakul, J.; Tongsook, C.; Pakotiprapha, D.; van Berkel, W. J.; Chaiyen, P., The reaction kinetics of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Rhodococcus josti* RHA1 provide an understanding of the para-hydroxylation enzyme catalytic cycle. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (49), 35210-35221.
28. Sucharitakul, J.; Chaiyen, P.; Entsch, B.; Ballou, D. P., Kinetic mechanisms of the oxygenase from a two-component enzyme, p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (25), 17044-17053.
29. Bruice, T. C., Mechanisms of flavin catalysis. *Accounts of Chemical Research* **1980**, *13* (8), 256-262.
30. Massey, V., Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (36), 22459-62.
31. Klinman, J. P., How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? *Accounts of Chemical Research* **2007**, *40* (5), 325-333.
32. Chaiyen, P.; Suadee, C.; Wilairat, P., A novel two-protein component flavoprotein hydroxylase. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268* (21), 5550-5561.

33. Alfieri, A.; Fersini, F.; Ruangchan, N.; Prongjit, M.; Chaiyen, P.; Mattevi, A., Structure of the monooxygenase component of a two-component flavoprotein monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (4), 1177-1182.
34. Visitsatthawong, S.; Chenprakhon, P.; Chaiyen, P.; Surawatanawong, P., Mechanism of Oxygen Activation in a Flavin-Dependent Monooxygenase: A Nearly Barrierless Formation of C4a-Hydroperoxyflavin via Proton-Coupled Electron Transfer. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (29), 9363-9374.
35. Ruangchan, N.; Tongsook, C.; Sucharitakul, J.; Chaiyen, P., pH-dependent studies reveal an efficient hydroxylation mechanism of the oxygenase component of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (1), 223-233.
36. de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W., Recent Developments in Flavin-based Catalysis. *ChemCatChem* **2013**, *5* (2), 403-415.
37. Pazmino, D. E. T.; Dudek, H. M.; Fraaije, M. W., Baeyer–Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (2), 138-144.
38. Bisagni, S.; Summers, B.; Kara, S.; Hatti-Kaul, R.; Grogan, G.; Mamo, G.; Hollmann, F., Exploring the Substrate Specificity and Enantioselectivity of a Baeyer–Villiger Monooxygenase from *Dietzia* sp. D5: Oxidation of Sulfides and Aldehydes. *Topics in Catalysis* **2014**, *57* (5), 366-375.
39. Jensen, C. N.; Cartwright, J.; Ward, J.; Hart, S.; Turkenburg, J. P.; Ali, S. T.; Allen, M. J.; Grogan, G., A flavoprotein monooxygenase that catalyses a Baeyer–Villiger reaction and thioether oxidation using NADH as the nicotinamide cofactor. *ChemBioChem* **2012**, *13* (6), 872-878.
40. Rioz-Martínez, A.; Kopacz, M.; De Gonzalo, G.; Pazmino, D. E. T.; Gotor, V.; Fraaije, M. W., Exploring the biocatalytic scope of a bacterial flavin-containing monooxygenase. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9* (5), 1337-1341.
41. Gross, R.; Buehler, K.; Schmid, A., Engineered catalytic biofilms for continuous large scale production of n-octanol and (S)-styrene oxide. *Biotechnology and Bioengineering* **2013**, *110* (2), 424-436.
42. Meyer, A.; Held, M.; Schmid, A.; Kohler, H. P. E.; Witholt, B., Synthesis of 3-tert-butylcatechol by an engineered monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *81* (5), 518-524.
43. Osborne, R. L.; Raner, G. M.; Hager, L. P.; Dawson, J. H., C. fumago Chloroperoxidase is also a Dehaloperoxidase: Oxidative Dehalogenation of Halophenols. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (4), 1036-1037.
44. Zhao, H.; Chen, D.; Li, Y.; Cai, B., Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Microbiological Research* **2005**, *160* (3), 307-313.
45. Van Pee, K.-H.; Unversucht, S., Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* **2003**, *52* (2), 299-312.

46. Hieber, A. D.; Bugos, R. C.; Yamamoto, H. Y., Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **2000**, *1482* (1), 84-91.
47. Holtmann, D.; Fraaije, M. W.; Arends, I. W.; Opperman, D. J.; Hollmann, F., The taming of oxygen: biocatalytic oxyfunctionalisations. *Chemical Communications* **2014**, *50* (87), 13180-13200.
48. Harayama, S.; Rekik, M., Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (26), 15328-15333.
49. Barnsley, E., Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate. *Journal of Bacteriology* **1976**, *125* (2), 404-408.
50. Johnsen, A. R.; Karlson, U., Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *76* (3), 533-543.
51. Spormann, A. M.; Widdel, F., Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **2000**, *11* (2-3), 85-105.
52. Suzuki, K.; Mizuguchi, M.; Ohnishi, K.; Itagaki, E., Structure of chromosomal DNA coding for *Pseudomonas putida* S-1 salicylate hydroxylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1996**, *1275* (3), 154-156.
53. Katagiri, M.; Yamamoto, S.; Hayaishi, O., Flavin adenine dinucleotide requirement for the enzymic hydroxylation and decarboxylation of salicylic acid. *Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237* (7), PC2413-PC2414.
54. Yamamoto, S.; Katagiri, M.; Maeno, H.; Hayaishi, O., Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide I. Purification and general properties. *Journal of Biological Chemistry* **1965**, *240* (8), 3408-3413.
55. Suzuki, K.; Katagiri, M., Mechanism of salicylate hydroxylase-catalyzed decarboxylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **1981**, *657* (2), 530-534.
56. Presswood, R.; Kamin, H., *Reactions of the reduced form of salicylate hydroxylase in Flavins and Flavoproteins* (Singer, TP, ed.) pp. 145-154. Elsevier, Amsterdam: 1976.
57. Wang, L.-H.; Tu, S.-C., The kinetic mechanism of salicylate hydroxylase as studied by initial rate measurement, rapid reaction kinetics, and isotope effects. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259* (17), 10682-10688.
58. Ballou, D. P.; Entsch, B.; Cole, L. J., Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *338* (1), 590-598.
59. Kunkel, T. A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82* (2), 488-492.
60. Costa, D. M. A. Estudos estruturais e bioquímicos das enzimas NahB e NahG de *Pseudomonas putida* G7 envolvidas na degradação do naftaleno. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

61. Hammersley, A.; Svensson, S.; Hanfland, M.; Fitch, A.; Hausermann, D., Two-dimensional detector software: from real detector to idealised image or two-theta scan. *International Journal of High Pressure Research* **1996**,*14* (4-6), 235-248.
62. (a) Mylonas, E.; Svergun, D. I., Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. *Journal of applied crystallography* **2007**,*40* (s1), 245-249;(b) Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O., SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *Journal of Applied Crystallography* **2000**,*33* (2), 218-225.
63. Petoukhov, M. V.; Franke, D.; Shkumatov, A. V.; Tria, G.; Kikhney, A. G.; Gajda, M.; Gorba, C.; Mertens, H. D.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I., New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* **2012**,*45* (2), 342-350.
64. (a) Doniach, S., Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering. *Chemical Reviews* **2001**,*101* (6), 1763-1778;(b) Rambo, R. P.; Tainer, J. A., Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. *Biopolymers* **2011**,*95* (8), 559-571;(c) Semisotnov, G. V.; Kihara, H.; Kotova, N. V.; Kimura, K.; Amemiya, Y.; Wakabayashi, K.; Serdyuk, I. N.; Timchenko, A. A.; Chiba, K.; Nikaido, K., Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering. *Journal of Molecular Biology* **1996**,*262* (4), 559-574.
65. Svergun, D., Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal* **1999**,*76* (6), 2879-2886.
66. Volkov, V. V.; Svergun, D. I., Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* **2003**,*36* (3 Part 1), 860-864.
67. Kozin, M. B.; Svergun, D. I., Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography* **2001**,*34* (1), 33-41.
68. Montgomery, H. A. C.; Thom, N. S.; Cockburn, A., Determination of dissolved oxygen by the winkler method and the solubility of oxygen in pure water and sea water. *Journal of Applied Chemistry* **1964**,*14* (7), 280-296.
69. McComb, R. B.; Bond, L. W.; Burnett, R. W.; Keech, R.; Bowers, G., Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clinical Chemistry* **1976**,*22* (2), 141-150.
70. Montersino, S.; Orru, R.; Barendregt, A.; Westphal, A. H.; van Duijn, E.; Mattevi, A.; van Berkel, W. J., Crystal structure of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase uncovers lipid-assisted flavoprotein strategy for regioselective aromatic hydroxylation. *The Journal of Biological Chemistry* **2013**,*288* (36), 26235-45.
71. BLAST<sup>®</sup> Standard Protein BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Acessado em 26/09/2014).
72. DeLano, W. L., The PyMOL molecular graphics system. **2002**.

73. Adams, P. D.; Baker, D.; Brunger, A. T.; Das, R.; DiMaio, F.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C., Advances, Interactions, and Future Developments in the CNS, Phenix, and Rosetta Structural Biology Software Systems. *Annual Review of Biophysics* **2013**, *42* (1), 265-287.
74. Putnam, C. D.; Hammel, M.; Hura, G. L.; Tainer, J. A., X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2007**, *40* (03), 191-285.
75. Mertens, H. D.; Svergun, D. I., Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology* **2010**, *172* (1), 128-141.
76. Svergun, D., Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography* **1992**, *25* (4), 495-503.
77. Jacques, D. A.; Guss, J. M.; Svergun, D. I.; Trewthella, J., Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2012**, *68* (6), 620-626.
78. Rambo, R. P.; Rodic, I. *Scatter*, 1.7; Lawrence Berkeley National Laboratory (Berkeley Lab), Berkeley, CA: 2012-2013.
79. Vorobiev, S. M.; Chen, Y.; Seetharaman, J.; Wang, D.; Mao, L.; Xiao, R.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Tong, L.; Hunt, J. F., Crystal structure of the flavin-containing monooxygenase phzS from *Pseudomonas aeruginosa*. *To be Published*.
80. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: John Wiley & Sons, 2012.
81. Eftink, M. R.; Ghiron, C. A., Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* **1981**, *114* (2), 199-227.
82. (a) Beechem, J. M.; Brand, L., Time-resolved fluorescence of proteins. *Annual Review of Biochemistry* **1985**, *54* (1), 43-71; (b) Michalet, X.; Weiss, S.; Jäger, M., Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (5), 1785-1813; (c) Weiss, S., Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. *Nature Structural Biology* **2000**, *7* (9), 724-729.
83. Keizer, J., Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (6), 1494-1498.
84. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*. New York: Freeman, 2010.
85. Möller, M.; Denicola, A., Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2002**, *30* (5), 309-312.
86. Marangoni, A. G., *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. New York: Wiley, 2003.
87. Stryer, L., *Bioquímica*. 4 ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996; p 1000.

88. Suzuki, K.; Mizuguchi, M.; Gomi, T.; Itagaki, E., Identification of a lysine residue in the NADH-binding site of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* S-1. *Journal of Biochemistry* **1995**, *117* (3), 579-585.
89. Suzuki, K.; Asao, E.; Nakamura, Y.; Nakamura, M.; Ohnishi, K.; Fukudat, S., Overexpression of salicylate hydroxylase and the crucial role of Lys163 as its NADH binding site. *Journal of Biochemistry* **2000**, *128* (2), 293-299.
90. Suzuki, K.; Ohnishi, K., Functional modification of an arginine residue on salicylate hydroxylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1990**, *1040* (3), 327-336.

# **ANEXOS**

**Anexo A. Dados de velocidade e coeficiente angular( $\alpha$ ) coletados em diferentes valores de pH.**

Perfil de pH -enzima NahG nativa						
pH	[NahG] $\mu$ M	[As] $\mu$ M	Coeficiente angular ( $\alpha$ )	Velocidade / $\mu$ M.s <sup>-1</sup>	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
9,46	0,128	0	0,000	0,000	2,99	0,065
		10	0,635	0,102		
		5	0,253	0,041		
		50	1,309	0,210		
		100	1,608	0,259		
		150	1,939	0,312		
		20	0,734	0,118		
		80	1,656	0,266		
8,6	0,128	0	0,000	0,000	2,49	0,069
		10	0,422	0,068		
		5	0,250	0,040		
		50	1,307	0,210		
		100	1,620	0,260		
		150	1,636	0,263		
		20	0,612	0,098		
		0	0,000	0,000		
6,86	0,128	10	0,384	0,062	1,59	0,067
		5	0,281	0,045		
		50	1,024	0,165		
		100	1,085	0,174		
		150	0,970	0,156		
		20	0,659	0,106		
		0	0,000	0,000		
		0	0,000	0,000		
7,15	0,128	10	0,677	0,109	2,21	0,107
		5	0,443	0,071		
		50	1,328	0,213		
		100	1,549	0,249		
		150	1,542	0,248		
		20	0,821	0,132		
		0	0,000	0,000		
		0	0,000	0,000		

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As] μM	Coeficiente angular (α)	Velocidade / μM.s <sup>-1</sup>	<i>k</i> <sub>cat</sub>	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
8,2	0,064	0	0,000	0,000	3,153	0,0774
		10	0,260	0,042		
		5	0,077	0,012		
		50	0,729	0,117		
		100	0,915	0,147		
		150	0,970	0,156		
		20	0,420	0,067		
5,8	0,064	0	0,000	0,000	1,198	0,8597
		10	0,517	0,083		
		5	0,464	0,075		
		50	0,549	0,088		
		100	0,516	0,083		
		200	0,682	0,110		
		150	0,522	0,084		
		20	0,548	0,088		
		2,5	0,399	0,064		
		0,816	0,212	0,034		
10	0,064	0	0,000	0,000	3,1222	0,0757
		10	0,303	0,049		
		50	0,682	0,110		
		100	0,949	0,152		
		150	1,057	0,170		
		20	0,552	0,089		
		2,5	0,121	0,020		
		70	0,897	0,144		
		90	0,931	0,150		
6,78	0,064	0	0,000	0,000	1,7685	0,2912
		10	0,445	0,071		
		5	0,440	0,071		
		50	0,711	0,114		
		100	0,720	0,116		
		150	0,931	0,150		
		20	0,672	0,108		
		2,5	0,261	0,042		

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As] μM	Coefficiente angular (α)	Velocidade μM.s <sup>-1</sup>	<i>k</i> <sub>cat</sub>	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
7,58	0,064	0	0,000	0,000	3,8936	0,2369
		10	0,593	0,095		
		5	0,507	0,081		
		50	1,242	0,200		
		100	1,403	0,226		
		150	1,480	0,238		
		20	0,945	0,152		
9,74	0,064	0	0,000	0,000	2,2653	0,0616
		10	0,296	0,048		
		5	0,234	0,038		
		50	0,512	0,082		
		100	0,801	0,129		
		150	0,833	0,134		
		20	0,336	0,054		
		200	0,809	0,130		
		30	0,420	0,068		
		66,7	0,713	0,115		
6,31	0,064	0	0,000	0,000	1,5853	0,6424
		10	0,580	0,093		
		5	0,326	0,052		
		50	0,675	0,109		
		100	0,588	0,095		
		150	0,805	0,129		
		20	0,644	0,104		
6,57	0,128	0	0,000	0,000	2,1552	0,0972
		10	0,621	0,100		
		5	0,315	0,051		
		50	1,322	0,213		
		100	1,441	0,232		
		150	1,569	0,252		
		20	0,903	0,145		

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As] μM	Coeficiente angular (α)	Velocidade μM.s <sup>-1</sup>	<i>k</i> <sub>cat</sub>	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
9,14	0,128	0	0,000	0,000	5,2206	0,1101
		10	0,786	0,126		
		5	0,484	0,078		
		50	2,293	0,369		
		100	2,860	0,460		
		70	2,419	0,389		
		20	1,176	0,189		
7,2	0,128	0	0,000	0,000	2,1411	0,0629
		10	0,471	0,076		
		5	0,304	0,049		
		50	1,183	0,190		
		100	1,324	0,213		
		150	1,452	0,233		
		20	0,631	0,101		
7,86	0,128	0	0,000	0,000	2,6275	0,0816
		10	0,532	0,086		
		5	0,347	0,056		
		50	1,384	0,223		
		100	1,830	0,294		
		150	1,749	0,281		
		20	0,775	0,125		
10,3	0,384	0	0,000	0,000	3,1219	0,0246
		10	0,927	0,149		
		5	0,746	0,120		
		50	2,216	0,356		
		100	2,982	0,479		
		150	3,907	0,628		
		20	1,398	0,225		
		171	4,531	0,728		
		300	3,734	0,600		
		360	4,018	0,646		
		270	5,204	0,837		

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As]μM	Coeficiente angular (α)	Velocidade / μM.s <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub>	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
10,66	0,384	0	0,000	0,000	1,3694	0,0238
		10	0,524	0,084		
		5	0,392	0,063		
		50	1,511	0,243		
		100	2,131	0,343		
		150	2,418	0,389		
		20	1,039	0,167		
		200	2,670	0,429		
		300	3,313	0,533		
9,7	0,384	0	0,000	0,000	1,8396	0,1124
		10	1,956	0,314		
		5	1,033	0,166		
		50	3,331	0,535		
		100	3,871	0,622		
		150	3,698	0,595		
		20	2,451	0,394		
		240	4,503	0,724		
10,97	0,64	0	0,000	0,000	0,7943	0,015
		10	0,363	1,608		
		15	0,314	2,412		
		50	1,986	8,039		
		100	2,096	16,077		
		150	2,272	24,116		
		20	0,815	3,215		
		300	2,953	48,232		
		30	1,485	4,823		
3,8	0,512	0	0,000	0,000	0,1807	0,5441
		10	0,611	0,098		
		5	0,563	0,090		
		50	0,672	0,108		
		100	0,680	0,109		
		150	0,760	0,122		
		20	0,634	0,102		
		2,5	0,544	0,087		
		1	0,529	0,085		
0,6	0,447	0,072				

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As] μM	Coeficiente angular (α)	Velocidade μM.s <sup>-1</sup>	<i>k</i> <sub>cat</sub>	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
4,32	0,512	0	0,000	0,000	0,3811	0,445
		10	1,083	0,174		
		5	1,038	0,167		
		50	1,018	0,164		
		100	0,923	0,148		
		0,6	0,532	0,086		
		20	0,952	0,153		
		1	0,625	0,101		
4,69	0,512	0	0,000	0,000	0,4465	0,9707
		10	1,521	0,245		
		5	0,974	0,157		
		50	0,743	0,119		
		100	0,606	0,097		
		0,5	0,842	0,135		
		20	0,994	0,160		
		15	1,062	0,171		
		12	1,413	0,227		
8	1,259	0,202				
5,7	0,512	0	0,000	0,000	0,6066	0,1813
		10	1,574	0,253		
		5	0,963	0,155		
		50	0,895	0,144		
		100	0,723	0,116		
		0,5	0,340	0,055		
		20	1,266	0,204		
		12	1,328	0,214		
8	1,378	0,221				

Perfil de pH - enzima NahG nativa						
pH	[NahG] μM	[As] μM	Coeficiente angular (α)	Velocidade μM.s <sup>-1</sup>	<i>k</i> <sub>cat</sub>	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>m</sub>
4,00	0,512	0	0,000	0,000	0,21	0,043
		10	0,486	0,078		
		5	0,410	0,066		
		50	0,653	0,105		
		100	0,732	0,118		
		150	0,928	0,149		
		20	0,519	0,083		
		2,5	0,377	0,061		
4,2	0,512	0	0,000	0,000	0,35	0,275
		10	1,086	0,175		
		5	0,951	0,153		
		50	1,129	0,181		
		100	0,971	0,156		
		150	0,928	0,149		
		20	1,018	0,164		

## Anexo B. Curvas de velocidade de reação em função da concentração de ácido salicílico em diferentes valores de pH

