

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Diego Magno Martins

**ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE A REATIVAÇÃO E A
ESTABILIDADE DA 1,2-DIHIIDROXINAFTALENO DIOXIGENASE
(DOXG)**

Belo Horizonte

2021

UFMG/ICEx/DQ. 1.456

D.791

Diego Magno Martins

**ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE A REATIVAÇÃO E A
ESTABILIDADE DA 1,2-DIHIIDROXINAFTALENO DIOXIGENASE
(DOXG)**

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

M379a Martins, Diego Magno
2021 Aspectos físico-químicos sobre a reativação e a
D estabilidade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase
(DOXG) [manuscrito] / Diego Magno Martins. 2021.
111 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. Físico-química
orgânica - Teses. 3. Catálise - Teses. 4. Enzimas -
Teses. 5. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos -
Teses. 6. Enzimas - Regulação - Teses. 7. Pseudomonas
- Teses. I. Brandão, Tiago Antônio da Silva,
Orientador. II. Título.

CDU 043



"Aspectos Físico-químicos Sobre a Reativação e a Estabilidade da 1,2-Dihidroxi-naftaleno Dioxigenase (DoxG)"

Diego Magno Martins

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão - Orientador
UFMG

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG

Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem
UFMG

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2021, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antonio da Silva Brandao, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2021, às 12:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ronaldo Alves Pinto Nagem, Servidor(a)**, em 19/08/2021, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento_acesso_externo=0, informando o código verificador **0899012** e o código CRC **0D0E1288**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado e me dar forças para caminhar.

Ao prof. Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão por ter me orientado na realização deste trabalho.

Pela dedicação, paciência e prontidão, muito obrigado!

Agradeço os meus familiares por todo apoio que me deram ao longo dessa jornada, em especial, aos meus tios, Selma e Arlindo, minha mãe Leda e meu irmão Hércules.

Aos professores Dr. Adolfo Henrique de Moraes Silva (UFMG), Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG) e Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas (UFMG) por aceitarem participar da banca avaliadora.

Gostaria de agradecer todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização de algum dos experimentos que fazem parte deste trabalho: Igor Forattini (UFMG), Lucius Flavius (UFMG), professora Dra. Clésia Cristina Nascentes Daniel (UFMG), professor Dr. Rubén Dario Sinisterra Millan (UFMG), professor Lindsay David Eltis (Universidade da Colúmbia Britânica, Canadá), e o Grupo de Biologia Estrutural do ICB/UFMG.

Aos meus amigos que têm me acompanhado ao longo dessa jornada. Em especial agradeço a Josimara e a Bárbara pelo companheirismo.

Agradeço a Lídia por ter me acolhido quando eu cheguei na UFMG. A Samara, que desde o primeiro dia que eu entrei no laboratório, fez com que eu me sentisse estar em casa. Ao Mozart que me auxiliou em todos os experimentos do mestrado e foi um orientador para mim. A Aline pelos debates filosóficos. E a todos demais amigos e colegas de laboratório.

A UFMG pela infraestrutura disponibilizada e ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado, obrigado por tudo!

*“We're living in a desperate time
Waking up to dreaming of a better life
We won't give up
Our love is like a warning sign
Revealing of a life that's all brand new
If only we can see it through
So reach to the sky
The life we have has come
This night of our lives
We've only just begun
Together we are bright as the stars
We're a light that will never die...”
The moment we come alive, Red*

RESUMO

Bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam um arsenal formidável de enzimas que permitem que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) sejam utilizados como única fonte de carbono. Dentre essas enzimas, a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas* sp. C18 (DoxG), uma extradiol dioxigenase Fe^{+2} -dependente, catalisa a conversão do 1,2-dihidroxi-naftaleno em 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato via uma dioxigenação. Uma reação que não encontra correspondência em síntese clássica. Essa enzima destaca-se por possuir um sítio ativo volumoso que a dota de promiscuidade, sendo capaz de clivar, além de uma série de catecóis, bifenis policlorados (BPCs). Essa formidável capacidade contrasta com a fácil oxidação do cofator Fe^{+2} pelo oxigênio presente no ar, processo observado durante a lise e purificação da enzima que leva a sua inativação. Nosso objetivo foi determinar quais fatores influenciam a reativação da enzima, bem como as estratégias para aprimorar sua estabilidade e atividade catalítica. A DoxG foi expressa e purificada em condições aeróbicas. A caracterização foi feita pela determinação de sua massa monomérica via eletroforese e experimentos de espalhamento dinâmico de luz consistentes com um estado octamérico com massa de aproximadamente 270 kDa em solução aquosa. A velocidade de reconstituição da holoenzima mostrou ser um processo sensível a vários fatores: (1) a incubação com o íon Fe^{2+} mostrou-se a forma mais eficiente de reativação; (2) a velocidade de reativação depende da concentração do íon Fe^{2+} ; (3) o pH de 5,75 propiciou a forma mais rápida de reativação, sendo que em meios mais alcalinos a disponibilidade do cofator foi limitada e em meios mais ácidos o processo foi afetado negativamente pela protonação de resíduos do sítio ativo que se complexam ao cofator; (4) embora a força iônica com NaCl ou KCl não afetou a reativação, sais ou tampões com ânions capazes de se ligar ao Fe^{+2} (ex. sulfato) afetaram a disponibilidade do mesmo; (5) a reativação de 90% da enzima requereu duas horas e meia de incubação com o íon Fe^{2+} . Além desses pontos, observou-se que o íon Mn^{+2} não pôde substituir o íon Fe^{+2} como cofator, no entanto, conferiu maior estabilidade a DoxG. Estudos de inativação térmica demonstraram que na presença de Mn^{+2} , a enzima não perdeu sua atividade consideravelmente após ser incubada por quarenta minutos a 60 °C. Os estudos de atividade enzimática mostraram que a DoxG foi capaz de catalisar a clivagem do catecol, 3-metilcatecol e 2,3-dihidroxi-bifenil, sendo que a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para a clivagem do 2,3-dihidroxi-bifenil foi 1000 vezes maior do que para o catecol e 10 vezes maior do que para o 3-metilcatecol.

Palavras-chave: Catálise enzimática, extradiol dioxigenase, reativação, estabilidade.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Pseudomonas* have a formidable arsenal of enzymes allowing them to use polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as the sole carbon source. Among these enzymes, the 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp.* C18 (DoxG), a Fe⁺²-dependent dioxygenase extradiol, catalyzes the conversion of 1,2-dihydroxynaphthalene to 2-hydroxy-2H-chromene-2-carboxylate via a dioxygenation. A reaction with no match in classical synthesis. This enzyme exhibits a large active site endorsing its promiscuity, which is able to cleave, in addition to a series of catechols, the polychlorinated biphenyls (BPCs). This formidable capacity contrasts with the facile oxidation of the Fe⁺² cofactor by the oxygen present in the air, a process that occurs throughout the lysis and purification of the enzyme and leads to its inactivation. Our goal is to determine the factors to efficient enzyme reactivation, as well as strategies to improve its stability and catalytic activity. Therefore, DoxG was expressed and purified under aerobic conditions. Characterization was done by its monomeric mass determined by electrophoresis and by its oligomeric state estimated using dynamic light scattering, which was consistent with an octamer in aqueous solution showing a molecular mass of about 270 kDa. The rate of holoenzyme reconstitution was sensitive to several factors: (1) incubation with Fe²⁺ was the most efficient form of reactivation; (2) the reactivation rate depends on concentration of the Fe²⁺; (3) the pH of 5.75 provided the fastest reactivation. In more alkaline media the availability of the cofactor was limited and in more acidic media the process was negatively affected by protonation of active-site residues involved in the complexation of the cofactor; (4) although the ionic strength using NaCl or KCl did not affect the reactivation, salts or buffers with anions capable of binding Fe⁺² (e.g. sulfate) affected its availability; (5) reactivation of 90% of the enzyme required two and a half hours of incubation with Fe²⁺. In addition, it was observed that Mn⁺² could not replace the Fe⁺² as cofactor, however, it provided greater stability to DoxG. Thermal inactivation studies showed that in the presence of Mn⁺², the enzyme did not lose its activity considerably after being incubated for forty minutes at 60 °C. The enzyme activity studies showed that DoxG was able to catalyze the cleavage of catechol, 3-methylcatechol, and 2,3-dihydroxybiphenyl. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for cleavage of 2,3-dihydroxybiphenyl was 1000-fold and 10-fold greater than catechol and 3-methylcatechol, respectively.

Keywords: Enzymatic catalysis, extradiol dioxygenase, reactivation, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: HPAs considerados como poluentes prioritários pela US EPA.....	17
Figura 2: Sítio ativo homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase (PDB 4GHG).....	29
Figura 3: Estruturas de raios-X da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG)	34
Figura 4: Perfil cromatográfico de eluição da DoxG em coluna de troca iônica	48
Figura 5: Perfil cromatográfico de eluição da DoxG em coluna de exclusão molecular	49
Figura 6: Perfil eletroforético da purificação da proteína DoxG. (a) SDS-PAGE 15% após coloração com Comassie Blue. (b) Logaritmo da massa molar conhecida (Canaleta A) em função da mobilidade eletroforética: os pontos marcados como triângulos coloridos referem-se a DoxG canaleta B, D e E e foram utilizados para estimar a massa da unidade monomérica.	50
Figura 7: Complexo octamérico da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) em diferentes posições.....	53
Figura 8: Espectro de espalhamento dinâmico de luz pela 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG).....	54
Figura 9: Atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase após ser incubada por diferentes tempos em diferentes pHs.....	58
Figura 10: Atividade específica da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase após ser incubada por 30 minutos em diferentes pHs.....	61
Figura 11: Efeito da concentração de íon ferroso na reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase	63
Figura 12: Efeito do tempo de incubação da enzima com íons Fe^{+2} no aumento da atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase.....	65
Figura 13: Efeito da presença de sais na extensão da reativação	66
Figura 14: Influência da força iônica na catálise enzimática para três concentrações distintas de 3-metilcatecol (0,05 M, 0,2 M e 0,4 M).....	70
Figura 15: Estrutura de alguns substratos da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG).....	71
Figura 16: Atividade relativa da DoxG na presença de diferentes concentrações de tolueno.....	72
Figura 17: Perfil de inativação térmica da DoxG.....	73
Figura 18: Perfil de inativação térmica da DoxG obtida em meio suplementado com excesso de ferro incubada ou não com cloreto de manganês (cada experimento foi realizado em duplicata) e	

da enzima obtida com meio de expressão e tampão de troca-iônica contendo manganês (quatuplicata).....	76
Figura 19: Um dos espectros de TXRF do tampão C eluido através da coluna de gel filtração.	78
Figura 20: Espectros de TXRF para a DoxG obtida de modo a conter diferentes concentrações dos cátions bivalentes Fe ⁺² e Mn ⁺²	80
Figura 21: Relação entre a % ferro e de manganês nas amostras da DoxG com a atividade específica após a reativação	81
Figura 22: Atividade específica da DoxG em função da porcentagem de ferro e manganês incorporado pela mesma	82
Figura 23: Perfil de Michaelis-Menten para a DoxG em diferentes concentrações de 3-metilcatecol em pH 6,5 e 25,0 ± 0,1 °C	85
Figura 24: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de catecol em pH 6,5 e 25 ± 0,1 °C.....	86
Figura 25: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de 2,3-dihidroxibifenil em pH 6,5 e 25 ± 0,1 °C.....	86
Figura 26: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de 2,3-dihidroxibifenil em pH 7,0 e 25 ± 0,1 °C.....	88

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Vias de ativação do benzo[a]pireno. Adaptado de Penning, 2014.	20
Esquema 2: Processos de oxirredução envolvidos na oxidação de um HPAs por uma oxigenase de Rieske.....	22
Esquema 3: Mecanismos de reação e de inativação propostos para as extradiol dioxigenases ..	26
Esquema 4: Mecanismo proposto por Christian e colaboradores (2012) para a transferência de próton, na homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase, do substrato para o superóxido mediada pela histidina 200.....	30
Esquema 5: Via metabólica de degradação do naftaleno em bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> , com destaque para os genes responsáveis por codificar as enzimas responsáveis por catalisar as reações da via superior em <i>Pseudomonas putida</i> G7	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Código atribuído a enzima, meio utilizado para expressar e condição de purificação utilizada.....	51
Quadro 2 - Valores das atividades das espécies e das constantes de equilíbrio obtidas para a os dados da Figura 10.....	60
Quadro 3 - Comparação da atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase incubada em tampão acetato e fosfato	62
Quadro 4 - Porcentagem de Fe, Mn, Co e Zn incorporados pela DoxG obtida em diferentes condições.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos para a 1,2-didroxinaftaleno dioxigenase (DoxG).	50
Tabela 2 - Concentração das diferentes enzimas obtidas calculadas via o método de Bradford. 52	
Tabela 3 - Atividade específica dos lotes da enzima DoxG	67
Tabela 4 - Valores das constantes cinéticas obtidas a partir do ajuste não-linear dos dados cinéticos nas Figuras 20, 21, 22 e 23 para a clivagem dos substratos pela DoxG em tampão fosfato 100 mM e $25 \pm 0,1$ °C.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angström
1,2-DHND	1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase
BphC	2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase
DHB	Dihidroxibifenil
DHN	Dihidroxi-naftaleno
DNA	ácido desoxirribonucleico
DoxG	1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de <i>Pseudomonas</i> sp. C18
EDL	espalhamento dinâmico de luz
g/L	gramas por litro
HPAs	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPCA	homoprotocatecuato
HPCD	homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
k_{cat}	constante catalítica
K_d	constante de ligação
kDa	kiloDalton
K_m	constante de Michaelis-Menten
kV	Quilovolts
mM	concentração milimolar
μM	concentração micromolar
NahC	1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de <i>Pseudomonas putida</i> G7
nm	Nanômetro
mΩ.cm	mili ohms vezes centímetro
PCBs	bifenis policlorados
PDB	Protein Data Bank
POPs	poluentes orgânicos persistentes
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TXRF	fluorescência de raios X por reflexão total
U.A.	unidades arbitrárias
U/mg	$\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$
UV/Vis	ultravioleta – visível

NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO O CÓDIGO DE UMA E TRÊS LETRAS

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
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

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	17
1.2 Biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	20
1.3 Extradiol dioxigenases	24
1.4 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase	31
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Reagentes	37
3.2 Extração do DNA plasmidial	37
3.3 Transformação de células por eletroporação	37
3.4 Expressão heteróloga da proteína DoxG em meio LB	38
3.5 Expressão heteróloga da proteína DoxG em meio mínimo M9	39
3.6 Lise de bactérias	40
3.7 Purificação das proteínas recombinantes	40
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3.9 Cálculo da concentração de proteínas pelo método de Bradford	42
3.10 Cálculo da concentração de metais nas amostras de proteínas utilizando TXRF	42
3.11 Espalhamento dinâmico de luz	43
3.12 Ensaio de atividade enzimática	43
3.12.1 Experimentos de reativação da DoxG	44
3.12.2 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten: K_m e k_{cat}	45
3.12.3 Inativação térmica	45
3.12.4 Efeito da adição de tolueno e sulfato de sódio na atividade enzimática	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Expressão e Purificação	47
4.2 Cálculo da concentração da enzima pelo método de Bradford	52
4.3 Determinação do estado oligomérico em solução da DoxG	53
4.4 Reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase	55
4.4.1 Efeito do pH na reativação	57
4.4.2 Efeito do tampão na reativação	62

4.4.3 Efeito da concentração de íon ferroso.....	63
4.4.4 Efeito do tempo de reativação.....	64
4.4.5 Efeito de sais sobre a reativação	66
4.5 Efeito do íon manganês na atividade enzimática.....	68
4.6 Efeito da Força Iônica e da Adição de Tolueno na Catálise Enzimática.....	70
4.7 Inativação Térmica da DoxG.....	73
4.8 Relação Entre Íons Presentes em Solução e a Atividade da DoxG	77
4.9 Cinética do Estado Estacionário	83
5. CONCLUSÕES.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7. ANEXOS.....	110
6.1 Anexo I: Resultado dos cálculos das concentrações pelo método de Bradford.....	110
6.2 Anexo II: % de metais presentes nas amostras de proteína.	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são um grupo de poluentes orgânicos persistentes (POPs) potencialmente tóxicos e que apresentam tendência a bioacumulação. Eles têm acompanhado a humanidade desde o seu início (Boffetta, Jourenkova, & Gustavsson, 1997). No entanto, a preocupação com essa classe de substâncias vem crescendo, pois, a quantidade emitida no meio ambiente aumentou drasticamente desde a metade do século XIX devido à revolução industrial (Cáslavský, & Kotlaríková, 2005).

Como o nome sugere, os HPAs são hidrocarbonetos cujas estruturas químicas caracterizam-se por apresentar dois ou mais anéis aromáticos conectados por meio do compartilhamento de um par de átomos de carbono adjacentes. Uma vez que são encontrados no meio ambiente com frequência e são tóxicos, 16 HPAs (Figura 1) fazem parte da lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) (Penning, 2014).

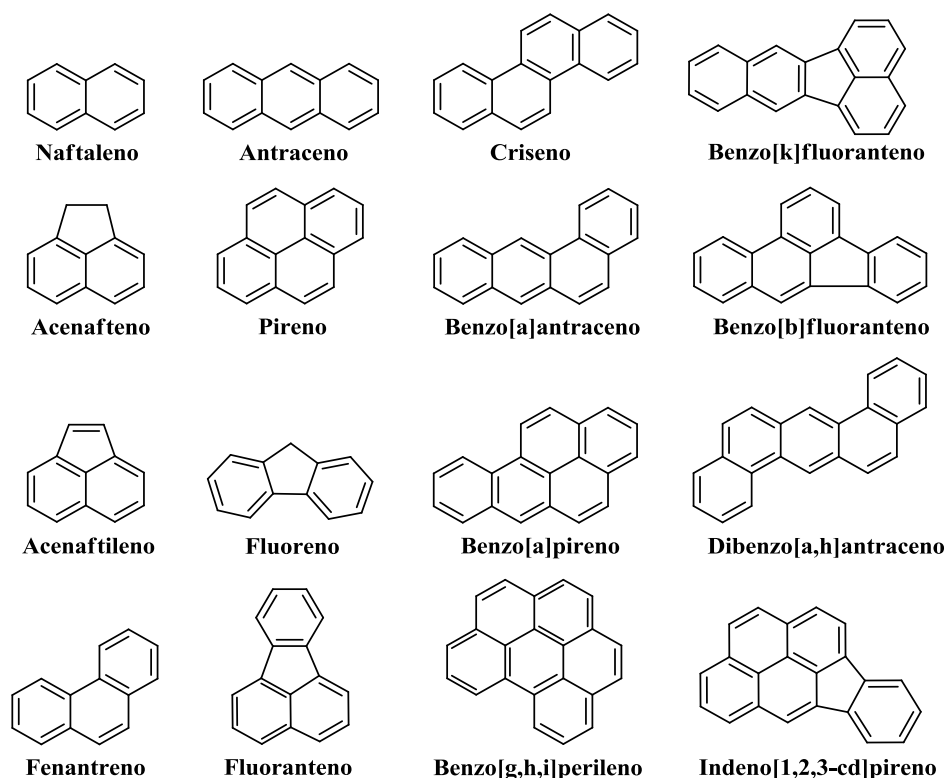


Figura 1: HPAs considerados como poluentes prioritários pela US EPA. Adaptado de Penning, 2014.

Esses hidrocarbonetos podem ser formados em processos naturais, como, por exemplo, nas erupções vulcânicas e na decomposição da matéria orgânica. Entretanto, embora ocorram naturalmente, algumas atividades antropogênicas vêm contribuindo como fontes de HPAs para matrizes ambientais, entre as quais destacam-se a produção de alcatrão e asfalto, craqueamento catalítico, gaseificação ou liquefação de combustíveis fósseis, refino/destilação de petróleo bruto e derivados, geração de calor e energia usando combustíveis, processos de tratamento de madeira, queima de lixo e resíduos, processos metalúrgicos e o desmatamento/incêndio de florestas (Mojiri, Zhou, Ohashi, Ozaki, & Kindaichi, 2019; Shen, 2013; Zhang, & Tao, 2009).

Fontes naturais e antropogênicas de HPAs, em combinação com fenômenos de transporte global, resultam em sua distribuição mundial e, conseqüentemente, os HPAs dispersos na atmosfera podem depositar-se sobre os solos e as águas, contaminando estes ambientes (Mojiri, 2019; Srogi, 2007).

Existe uma diferença considerável nos perfis das fontes de HPAs entre os países que se deve principalmente ao grau de desenvolvimento, cobertura vegetal e estrutura energética. Em muitos países em desenvolvimento como Índia, China e Indonésia, a queima de biomassa é a fonte de emissão mais importante de HPAs, contribuindo com mais da metade das emissões totais. Os populares fogões a lenha são a principal fonte de emissão de HPAs nos Estados Unidos, chegando a representar cerca de 57% do total. Em países onde ocorrem incêndios florestais generalizados todos os anos, as queimadas das florestas são a principal fonte de emissão, como no Brasil e na Angola, em que essa forma contribui com cerca de 60% e 77% das emissões totais, respectivamente. A queima de combustíveis pelos veículos também é uma fonte importante de HPAs, representando um oitavo do total das emissões globais, sendo que a contribuição relativa dos automóveis está aumentando em países sob transição econômica (Shen, 2013).

Após serem gerados, devido à baixa volatilidade, HPAs que possuem alta massa molecular – formados por mais de três anéis – são comumente encontrados adsorvidos a superfícies de partículas ou sedimentos. Já os de baixa massa molecular, suas formas líquidas apresentam alta pressão de vapor, por isso, se encontram principalmente no estado gasoso como contaminantes atmosféricos (Kim, Choe, & Change, 2011; Purcaro, Moret, & Conte, 2013; Zhang, & Tao, 2009).

A massa molecular não influencia apenas na distribuição do hidrocarboneto no meio ambiente, mas, também na sua persistência. Em geral, os que possuem alta massa molecular

tendem a ser mais recalcitrantes devido à baixa solubilidade e volatilidade e a uma maior resistência a lixiviação (Forsgren, 2015; Wild, & Jones, 1995).

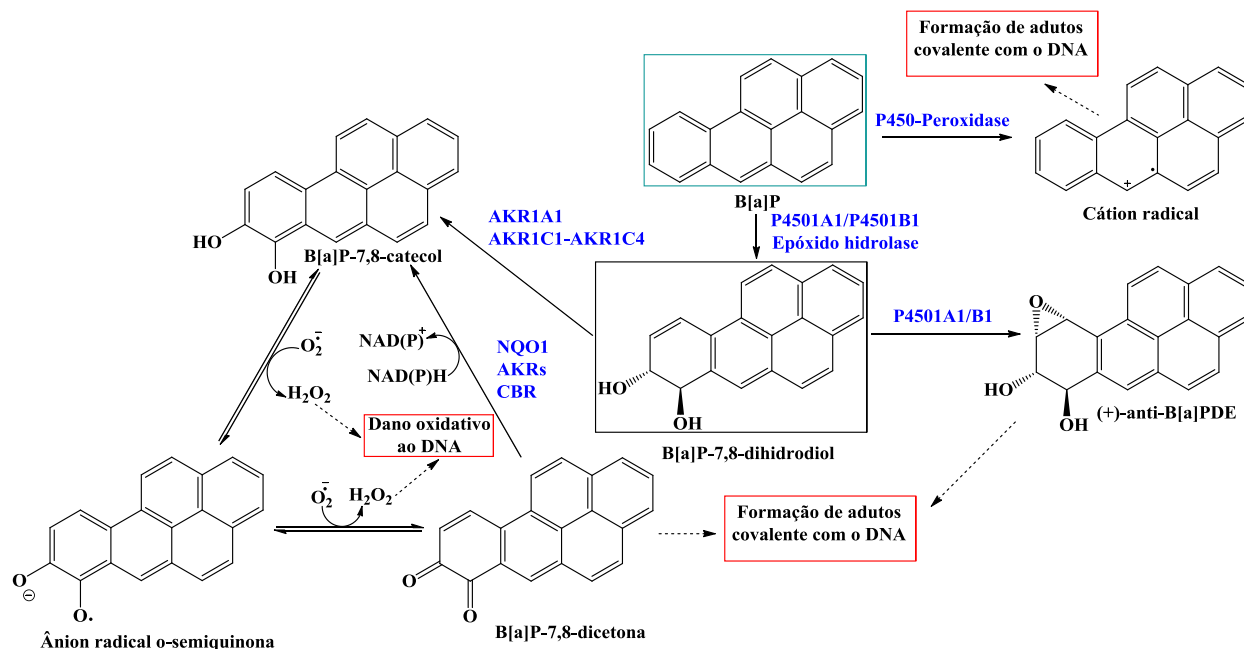
Em um estudo desenvolvido por Kuśmierz e colaboradores (2016), em que se avaliou a permanência de HPAs em solo tratado com carvão vegetal, foi observado tempo de meia-vida médio de 141 dias para HPAs contendo 3 anéis, 400 dias para os de 4 anéis, 863 para o de 5 anéis e 1165 para os compostos contendo 6 anéis. Embora esses valores possam ser diferentes em outros ambientes devido ao fato de a persistência desses poluentes depender de vários fatores, tais como a concentração do contaminante, tipo de solo, pH e temperatura do local, esses resultados ilustram bem como estes compostos podem ser persistentes (Maliszewska-Kordybach, 1993; Wild, & Jones, 1995).

A intoxicação de seres humanos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da inalação ocorre principalmente em ambientes urbanos, onde se encontram em maior concentração no ar, se comparada aos ambientes rurais, devido à baixa dispersão dos poluentes atmosféricos e o grande fluxo de veículos (Srogi, 2007). Mas em casos de fumantes ou pessoas que trabalham em indústrias que emitem esses poluentes, estas são importantes fontes de intoxicação, que ainda incluem a absorção pela pele como uma importante rota de contaminação (Boffetta et al., 1997). Já o consumo de carnes defumadas e alimentos cozidos ou assados em excesso são as principais fontes de intoxicação alimentar.

A exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos tem chamado a atenção nos últimos anos, principalmente, porque estudos têm mostrado que essas substâncias em geral são altamente carcinogênicas e mutagênicas (IARC, 2011). De fato, há um significativo aumento da ocorrência de certos tipos de câncer em trabalhadores de indústrias em que há uma alta exposição a HPAs (Boffetta et al., 1997; Srogi, 2007).

Mecanismos têm sido propostos para explicar o motivo de alguns HPAs serem cancerígenos. No Esquema 1 alguns desses mecanismos são mostrados para o benzo[a]pireno. Um deles é formação de cátions radicais catalisada pela peroxidase P450. Outra via envolve a formação de diol-epóxido. Nesta o benzo[a]pireno sofre uma monooxigenação catalisada pelo citocromo P4501A1 (hepático) ou P451B1 (extra-hepático) no benzo-anel terminal, sendo que a subsequente hidrólise leva a formação de um trans-dihidrodiol. Este composto pode sofrer uma segunda epoxidação levando a formação de um dihidrodiolepóxido capaz de reagir com as bases nucleotídicas do DNA, podendo, assim, iniciar um processo mutagênico. Outra via envolve

dihidrodiol desidrogenases membros da superfamília de aldo-ceto redutase (AKR), que oxidam o HPAs gerando quinonas. A oxidação resulta em um catecol que é instável e sofre auto-oxidação para dar origem a *o*-quinona com a produção concomitante de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem reagir com o DNA causando danos no mesmo. E uma vez formada, a *o*-quinona é um aceptor de Michael extremamente reativo que pode formar um aduto covalente com o DNA (Penning, 2014; Zhang, Jin, Huang, & Penning, 2012).



Esquema 1: Vias de ativação do benzo[a]pireno. Adaptado de Penning, 2014.

1.2 Biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Após serem emitidos, os HPAs podem ser degradados na atmosfera por reações radiculares que levam a inserção de grupos hidroxila nas duplas ligações (Kim et al., 2011; Lammel, 2015). Além disso, diversas bactérias, fungos e algas são capazes de utilizar compostos aromáticos como única fonte de carbono (Beckham, Johnson, Karp, Salvachúa, & Vardon, 2016; Dangi, Sharma, Hill, & Shukla, 2019). Essa capacidade incomum ocorre a despeito da elevada estabilidade decorrente da aromaticidade e origina moléculas com importantes funções tanto para a manutenção da estrutura, como da energética do sistema biológico. Dentre as moléculas aromáticas comumente metabolizadas estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Bamforth, & Singleton, 2005; Peng et al., 2008).

Mas devido à natureza recalcitrante desses POPs, durante as últimas décadas várias estratégias vêm sendo desenvolvidas visando possibilitar a remoção destes contaminantes do meio ambiente. Algumas delas são métodos biológicos tais como: biorreatores, fitorremediação e biorremediação. Outras são métodos físico-químicos como a utilização de membranas, coagulação, processos avançados de oxidação e a adsorção. Além disso, estratégias que utilizam métodos de tratamento combinados vêm sendo testadas para remover esses contaminantes de efluentes aquáticos (Mojiri, 2019).

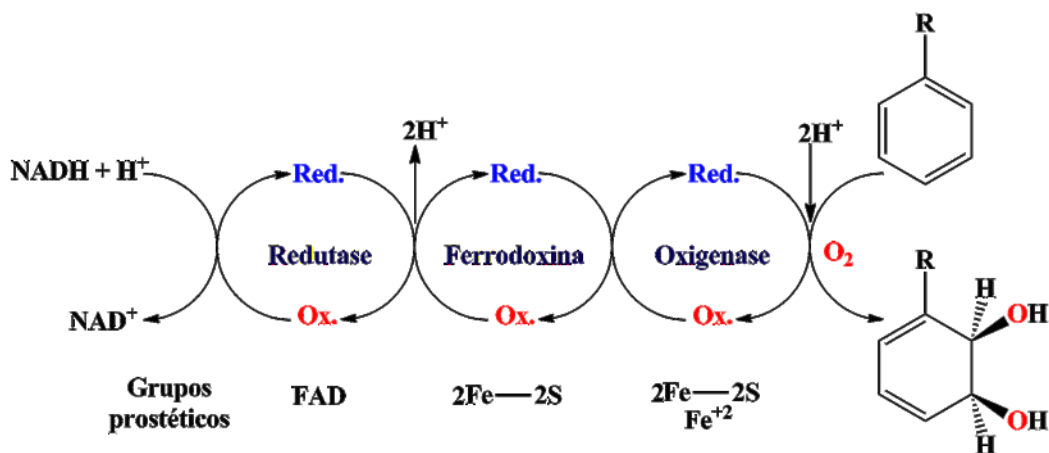
Comparado a outras formas de remediação disponíveis, a biorremediação tem provado ser uma metodologia promissora na medida em que: (i) muitos microrganismos capazes de transformar os HPAs utilizando os como fonte de carbono e energia foram isolados, identificados e caracterizados por numerosos estudos; (ii) espécies bacterianas, fúngicas e algas capazes de degradar estes compostos foram isoladas e utilizadas em escala laboratorial e de campo, com avanços significativos; (iii) e estratégias e protocolos de biorremediação foram projetados, otimizados e adotados para recuperar ambientes terrestres e aquáticos contaminados por HPAs, tendo considerável sucesso (Alegbeleye, Opeolu, & Jackson, 2017).

A biorremediação, embora apresente limitações, tal como o fato de necessitar de um longo período de tratamento, é uma boa alternativa à métodos físico-químicos como a incineração ou a lavagem do solo. Isso porque, uma vez que essa técnica consiste na utilização de organismos capazes de promover a degradação do contaminante gerando substâncias menos tóxicas, apresenta alto potencial para o tratamento *in situ* – tratamento feito no próprio local da contaminação – e não é necessário tratamento dos resíduos gerados (Gan, Lau, & Ng, 2009). Sendo que uma forma de melhorar a eficiência dessa abordagem é o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados contendo enzimas capazes de degradar estes contaminantes mais rapidamente (Habe, & Omori, 2003; Parales, et al., 2000).

Nas últimas décadas, muitos microrganismos capazes de mineralizar HAPs foram isolados (Peng et al., 2008). Sabe-se que alguns tipos de fungos, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans* e *Aspergillus niger* são capazes de degradar esses POPs. Já entre os gêneros de bactérias que possuem essa habilidade encontram-se as *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, entre outros (Mueller, Cerniglia, & Pritchard, 1996). Sendo que existem diferenças no mecanismo de degradação entre os organismos.

No caso das vias metabólicas utilizadas por bactérias na degradação aeróbica desses compostos aromáticos – que já estão bem descritas na literatura (Bamforth, & Singleton, 2005; Peng et al., 2008; Seo, Keum, & Li, 2009), a *cis*-di-hidroxiilação do areno, catalisada por dioxigenases de Rieske, é o passo inicial do processo de metabolização de HAPs (Morikawa, 2010).

As oxigenases de Rieske caracterizam-se por um sistema complexo de enzimas composto por três componentes (Esquema 2): uma redutase, uma oxigenase e uma ferredoxina. No sítio ativo da redutase, o NAD(P)H é oxidado à NAD(P)⁺ ao perder dois elétrons que ficarão armazenados em um grupo flavina, que serão posteriormente transferidos para um centro de Rieske [2Fe-2S]. Por fim, a transferência dos elétrons da ferredoxina para o ferro não-hémico possibilitará que o dioxigênio seja inserido no substrato (Ferraro, Gakhar, & Ramaswamy, 2005; Parales, & Ju, 2011).



Esquema 2: Processos de oxirredução envolvidos na oxidação de um HPAs por uma oxigenase de Rieske. Adaptado de Parales, & Ju, 2011.

Após a formação do *cis*-diol, uma reação catalisada por uma dihidrodiol desidrogenase levará à formação de um composto catecólico (Penning, 1993). Uma vez que este é formado, ele será clivado na posição *orto* ou *meta* por uma dioxigenase: A clivagem entre os carbonos ligados a hidroxila acontece se o composto for substrato de uma intradiol dioxigenase – enzima que utiliza um íon férrico, como cofator, para inserir o dioxigênio no substrato. Já a quebra adjacente as hidroxilas ocorre se o composto for alvo de uma extradiol dioxigenase. Neste caso o cofator utilizado pela enzima na inserção do oxigênio molecular no substrato é um íon Fe²⁺ (Costas, Mehn, Jensen, & Que, 2004; Elgren et al., 1997;).

O mecanismo das intradióis dioxigenases é mais bem compreendido do que das extradiol dioxigenases. Isso se deve ao fato de possuírem maior estabilidade, o que facilita estudos espectroscópicos e possibilita que intermediários de reação possam ser caracterizados (Costas et al., 2004; Elgren et al., 1997). No entanto, um dos interesses nas extradiol dioxigenases surge do fato do potencial que estas apresentam para serem utilizadas na degradação de outro tipo de POP: os bifenis policlorados (Vaillancourt et al., 1998).

Os bifenis policlorados (PCBs) caracterizam-se por dois anéis benzênicos ligados entre si, sendo que as cinco posições remanescentes em cada um dos anéis podem estar ligadas a um átomo de cloro como grupo substituinte (Manzetti, van der Spoel, & van der Spoel, 2014; Passatore, Rossetti, Juwarkar, & Massacci, 2014).

Os PCBs foram amplamente produzidos a partir de 1929 até a década de 1970, sendo que a estimativa é que 1,5 milhões de toneladas foram geradas em todo o mundo. Devido à alta constante dielétrica e estabilidade térmica, as aplicações industriais desses compostos incluem a sua utilização como lubrificantes, fluidos dielétricos e plastificantes. Contudo, uma vez que estes compostos são tóxicos e persistentes, foram proibidos na maioria dos países desde 1979 (Aken, Correa, & Schnoor, 2010; Faroon, & Ruiz, 2016). Isso levou a uma redução drástica na produção, mas os PCBs ainda são encontrados imprudentemente em produtos, tal como em tintas (Hu, & Hornbuckle, 2010).

Estudos evidenciam que a exposição a PCBs está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, doenças hepáticas, distúrbios hormonais e imunológicos, efeitos neurológicos, infertilidade, entre outras (Carpenter, 2006; Faroon, & Ruiz, 2015; Perkins, et al., 2016).

Assim como no caso dos HPAs, a distribuição dos bifenis policlorados no meio ambiente depende de suas propriedades físico-químicas, sendo a constante de partição octanol-água ($\log K_{OW}$) um parâmetro capaz de fornecer uma conjectura sobre a disseminação desses contaminantes. Isso porque, PCBs com $\log K_{OW}$ acima de 6 são encontrados principalmente associados a material particulado na atmosfera, solos e sedimentos, já aqueles em que o valor da constante de partição octanol-água é menor, apresentam menor peso molecular e ponto de ebulição, sendo mais solúveis em ambientes aquosos e podendo ser mais facilmente encontrados na fase aquosa, o que facilita o seu transporte por longas distâncias (Aken et al., 2010).

Os compostos aromáticos são estáveis devido à deslocalização dos elétrons das ligações π conjugadas que dão origem a um orbital molecular de baixa energia. A inserção de átomos de cloro nestes anéis, como é o caso dos PCBs faz com que estes compostos se tornem mais estáveis e menos solúveis em água, fazendo com que os análogos que possuem uma maior quantidade de átomos de cloro sejam ainda mais recalcitrantes à biodegradação. Isso é acentuado, pois o metabolismo dos PCBs é frequentemente desfavorável do ponto de vista energético, o que faz com que microrganismos capazes de mineralizar esses contaminantes necessitem de uma fonte adicional de carbono (Aken et al., 2010).

Assim como na via de degradação aeróbica dos HPAs, em bactérias, o passo inicial da metabolização dos bifenis envolve uma dioxigenase capaz de inserir hidroxilas no composto. Quando o 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHB) é formado, a extradiol dioxigenase responsável por clivar este composto é a 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase (*BphC*) (Pieper, & Seeger, 2008). As extradiol dioxigenases das vias de degradação dos bifenis parecem ser capazes de transformar vários PCBs embora haja diferença quanto a especificidade do substrato (Dai et al., 2002; McKay, Prucha, Reineke, Timmis, & Pieper, 2003). Não obstante, até mesmo as melhores cepas, têm uma baixa capacidade de converter PCBs contendo mais de quatro átomos de cloros, e nenhuma delas é capaz de degradar completamente os congêneres pouco clorados. Este é o caso, por exemplo, da *Burkholderia xenovorans* LB400, que é uma das melhores cepas de degradação de PCBs, mas que converte o 2,2,5,5-tetraclorobifenil em um correspondente 3,4-dihidroxibifenil – que é um metabólito não reativo frente a clivagem pela *BphC* (Fortin et al., 2005a; Lloyd-Jones, Ogden, & Williams, 1995).

1.3 Extradiol dioxigenases

As extradiol dioxigenases são encontradas em vias metabólicas da degradação de compostos aromáticos monociclos e policíclicos (Lipscomb, & Orville, 1992; Vaillancourt, Bolin, & Eltis, 2006). Essas enzimas catalisam a incorporação de ambos os átomos de oxigênio do O_2 no substrato catecólico levando a formação do semialdeído que é, nestes organismos, rapidamente degradado para metabólitos do ciclo do ácido cítrico (Lipscomb, 2008).

Sabe-se que as intradióis dioxigenases e extradiol dioxigenases vêm de linhas evolutivas distintas. E diferentemente das intradiol dioxigenases, em que todas as enzimas vêm de uma única linha evolutiva, a análise das estruturas e sequências de aminoácidos de várias extradiol

dioxigenases revelam que há pelo menos três famílias evolutivamente independentes. Estas são classificadas como extradiol dioxigenases do tipo I, II ou III (Eltis, & Bolin, 1996; Dunwell, Culham, Carter, Sosa-Aguirre, & Goodenough, 2001; Vaillancourt et al., 2006).

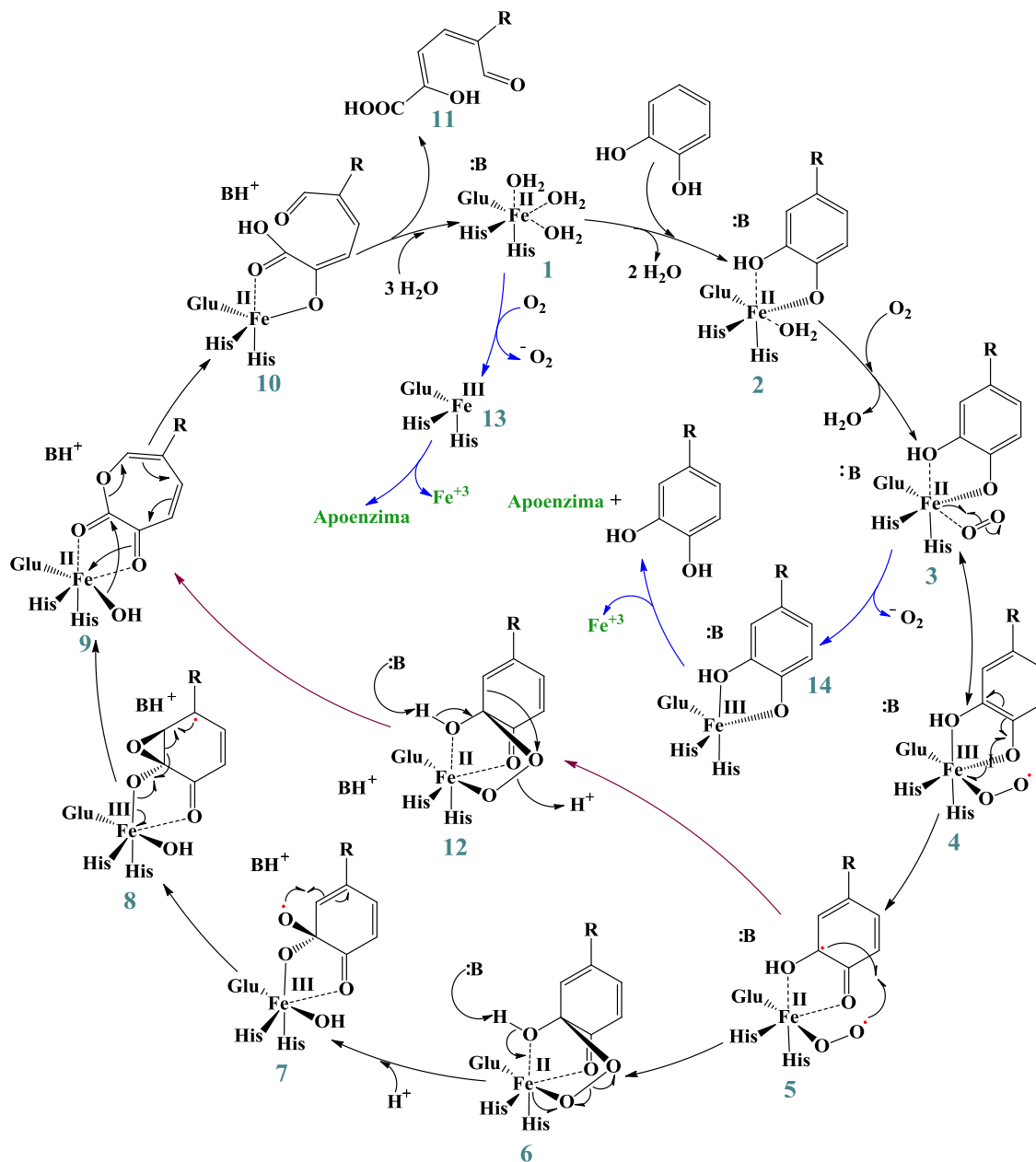
Não há correlação estrita entre a especificidade do substrato e a origem evolutiva nas extradiol dioxigenases. Por exemplo, existem estradiol dioxigenases do tipo I e II capazes de converter homoprotocatecuato (HPCA). Outro caso é o fato de que há tanto catecol 2,3-dioxigenases do tipo I quanto do tipo II (Vaillancourt et al., 2006).

Diferente das do tipo I e III, não se sabe se as extradiol dioxigenases do tipo II pertencem a uma superfamília. No caso das do tipo III, estas enzimas pertencem à superfamília do cupin, que incluem as gentisato dioxigenases, 1-hidroxi-2-naftato dioxigenases, entre outras (Dunwell et al., 2001). Já as extradiol dioxigenases do tipo I pertencem à superfamília quelantes do oxigênio vicinal (QOV) que possui um domínio estrutural conservado que inclui quatro folhas β e uma hélice α que ocorrem na sequência $\beta\alpha\beta\beta$ (Armstrong, 2000).

As extradiol dioxigenases estão entre as primeiras enzimas contendo o íon Fe^{2+} no sítio ativo a serem reconhecidas. O estudo destas enzimas vem contribuindo para a compreensão sobre a ativação do dioxigênio e a forma que são incorporados ao substrato em enzimas contendo o ferro não-hémico (Kovaleva, & Lipscomb, 2008a).

Eltis e Bolin (1996) ao comparar as estruturas primárias de 35 extradiol dioxigenases observaram a presença de nove resíduos conservados nessas enzimas. Três destes não se encontram próximos ao sítio ativo e possivelmente desempenham papel no enovelamento da enzima ou manutenção da estrutura. Outros três são duas histidinas e um glutamato que estão coordenados ao Fe^{2+} do sítio ativo, constituindo a tríade facial 2-His-1-caboxilato (Koehntop, Emerson, & Que Jr, 2005; Kovaleva, & Lipscomb, 2008a). Os demais resíduos são duas histidinas e uma tirosina que auxiliam na ligação do substrato, O_2 ou em alguma etapa do mecanismo da catálise.

As estruturas de vários membros da classe das extradiol dioxigenases foram determinadas por difração de raios-X. Além disso, estudos espectroscópicos e cinéticos têm possibilitado a proposição de uma proposta mecanística para as catecol 2,3-dioxigenases (Esquema 3) (Bugg, & Lin, 2001; Guengerich, & Yoshimoto, 2018; Vaillancourt et al., 2006; Wang, Li, & Lui, 2017), apesar de ainda não haver um consenso sobre todas as etapas do mecanismo (Liu, Tu, Xie, & Li, 2017).



Esquema 3: Mecanismos de reação e de inativação propostos para as extradiol dioxigenases. Fonte: o autor.

Inicialmente, o catecol liga-se ao sítio metálico como um quelante bidentado, apresentando geometria *trans* em relação as histidinas (2) (Han, Eltis, Timmis, Muchmore, & Bolin 1995; Sato et al., 2002; Vetting et al., 2004). Utilizando estudos de espectroscopia Raman, UV/Vis e análise de estruturas cristalográficas, Vaillancourt e colaboradores (2002a) determinaram que o 2,3-dihidroxibifenil liga-se como monoânion ao sítio ativo da 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase. O oxigênio ligado à C2 é desprotonado por uma tirosina da segunda esfera de coordenação antes da

formação do complexo enzima-ligante. Outro estudo que evidencia que o substrato se liga como monoânion foi realizado por Ishida e colaboradores (2005). Neste trabalho o 3-formilcatecol – substrato que apresenta absorção em regiões distintas para as formas neutra, monoaniônica e dianiônica – foi utilizado em estudos cinéticos e as conclusões dos autores foram as mesmas que as obtidas por Vaillancourt e colaboradores (2002a).

A formação do complexo enzima-substrato **(2)** implica na saída de duas ou três moléculas de água do sítio ativo, permitindo que um sítio de coordenação fique livre e conseqüentemente possibilitando a ligação do O₂ ao Fe²⁺ **(3)** (Sato et al., 2002). O dioxigênio é aparentemente ativado após o cátion bivalente transferir-lhe um elétron **(4)**, retornando no próximo ao passo ao seu estado de oxidação inicial mediante a transferência de um elétron do substrato **(5)** (Mbughuni et al., 2010; Mbughuni et al., 2011). Esse processo fará com que ambas as espécies adquiram caráter radicalar **(6 e 12)** (Arciero, & Lipscomb, 1986; Sanvoisin, Langley, & Bugg, 1995; Shu, Chiou, Orville, Miller, Lipscomb, & Que, 1995; Spence, Langley, & Bugg, 1996).

Após a formação do alquilperoxo ligado ao Fe²⁺, dois possíveis mecanismos levam a formação da lactona cíclica **(9)**. As proposições iniciais consideravam que a protonação do oxigênio do radical superóxido que está ligado ao íon metálico facilitaria a quebra heterolítica da ligação O–O em um mecanismo concertado conhecido como rearranjo de Criegee **(12)** (Bugg, & Lin, 2001; Kovaleva, & Lipscomb, 2008a; Vaillancourt et al., 2006).

A outra proposição que tem ganhado destaque envolve a formação de um epóxido **(8)** que precede a formação da lactona de sete membros **(9)**. Uma das evidências que suportam essa proposta mecanística é o fato do intermediário *gem*-diol **(7)** ter sido observado por difração de raios-X na conversão do substrato alternativo 4-sufonilcatecol (Kovaleva, & Lipscomb, 2008b). Todavia, cálculos computacionais sugerem que a formação do *gem*-diol na conversão do homoprotocatecuato pela HPCD é desfavorável do ponto de vista energético (Borowski, Georgiev, & Siegbahn, 2010; Christian, Ye, & Neese, 2012; Georgiev, Borowski, Blomberg, & Siegbahn, 2008). Ainda que evidências computacionais amparem a hipótese da existência do epóxido transiente por um curto período durante o ciclo catalítico (Dong, Shaik, & Lai, 2013; Siegbahn, & Haeffner, 2004), mais evidências experimentais precisam ser obtidas para caracterizar essa espécie, caso ela realmente exista (Borowski, Wójcik, Miłaczewska, Georgiev, Blomberg, & Siegbahn, 2012; Lipscomb, 2008). Por fim, o outro oxigênio do dioxigênio – agora como uma hidroxila ligada ao íon ferroso – irá atacar o carbono carbonílico da lactona formando o

semialdeído após a abertura do anel (**10**). O produto (**11**) ao ser deslocado por moléculas de água deixará o sítio ativo disponível para converter outra molécula de substrato (**1**) (Arciero, Orville, & Lipscomb, 1985; Lipscomb, 2008).

Além do mecanismo de reação que leva a formação do produto, dois processos envolvendo a oxidação do cofator que podem levar a inativação das extradiol dioxigenases são bem discutidos na literatura (Esquema 3). Um destes pode ocorrer durante a lise celular, purificação ou armazenamento da enzima. Isso porque, o contato com o dióxigênio pode converter o íon ferroso ao íon férrico (**13**), sendo que este último é incapaz de mediar a transferência de elétrons no curso reacional (Cerdan, Wasserfallen, Rekik, Timmis, & Harayama, 1994; Eltis, Hofmann, Hecht, Lünsdorf, & Timmis, 1993).

O outro mecanismo de inativação envolve uma inibição suicida. Neste processo, após o agente oxidante retirar um elétron do cofator, abandonando o sítio ativo na forma de superóxido, o sítio ativo contendo o íon Fe^{+3} (**14**) será incapaz de dar continuidade a clivagem do catecol (Vailancourt, Labbe, Drouin, Fortin, & Eltis, 2002b).

Resíduos conservados também são observados na segunda esfera de coordenação das extradiol dioxigenases, dentre os quais se destaca uma tirosina (Figura 2). Alguns trabalhos sugerem que o seu papel vai muito além de simplesmente desprotonar o substrato antes que este se ligue ao metal. Estudos estruturais com a HPCD, indicam que esse resíduo faz dois tipos diferentes de interação com o substrato (Kovaleva, & Lipscomb, 2007; Kovaleva, & Lipscomb, 2012; Vetting et al., 2004): (i) há uma interação de van der Waals entre a hidroxila da tirosina e o carbono C2 do substrato, forçando uma leve deformação global no anel aromático; (ii) o grupo fenólico da tirosina forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio, desprotonado, ligado ao C2 do substrato. Essa segunda interação promove uma distorção mais substancial no plano do anel. Ambas as distorções ajudam na transferência de um elétron do substrato para o oxigênio levando a formação das espécies radicalares.

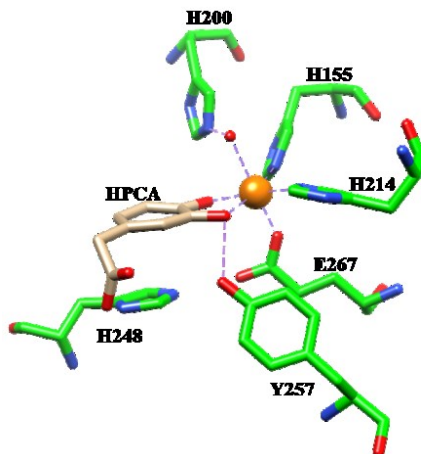


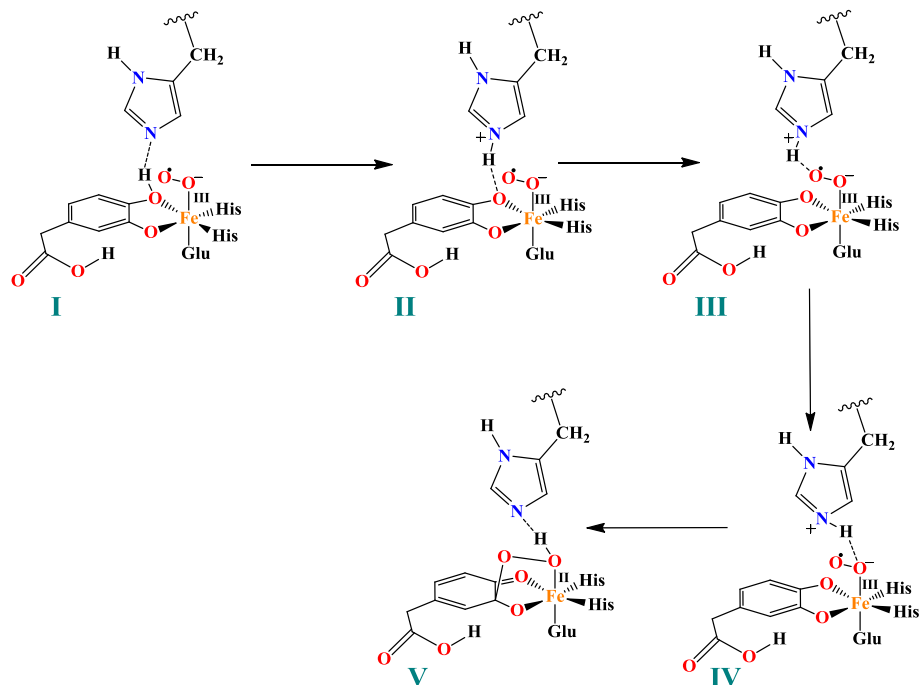
Figura 2: Sítio ativo homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase (PDB 4GHG). Destaque para os resíduos conservados na primeira e segunda esfera de coordenação (em verde) mostrando as interações estabelecidas entre a tríade fácil 2-His-1-carboxilato formando o complexo com o íon ferroso, ligação de hidrogênio entre histidina 200 e uma água complexada ao ferro e a interação de hidrogênio entre a tirosina 257 com um dos oxigênios do substrato (em bege) – que se encontra complexado ao íon Fe^{+2} .

A catálise ácido-base é fundamental no mecanismo catalítico das extradiol dioxigenases (Lin, Reid, & Bugg, 2001). Se por um lado é necessária uma base para desprotonar o substrato para que, em sua forma monoaniônica, se ligue ao cátion. Por outro um ácido precisa fornecer um próton ao radical superóxido em uma etapa posterior no decorrer da reação – papel comumente atribuído a uma das histidinas conservadas da segunda esfera de coordenação – sendo que estudos experimentais têm demonstrado que a protonação do alquilperóxido é importante para que haja a quebra da ligação O–O (Cho, Jung, Lee, & Rhee, 2009; Meier et al., 2015).

O papel desta histidina tem intrigado os pesquisadores. Sugere-se que o próton que será transferido ao oxigênio vem de substrato quando este é desprotonado uma segunda vez. Contudo, a forma como esse processo ocorre e o papel da histidina têm sido alvo de investigações e muitas indagações durante as últimas décadas (Emerson, Kovaleva, Farquhar, Lipscomb, & Que, 2005; Groce, & Lipscomb, 2005; Kovaleva, Rogers, & Lipscomb, 2015; Liu et al., 2017; Meier et al., 2015).

Christian e colaboradores (2012) estudaram a transferência de próton através de cálculos computacionais usando a teoria do funcional de densidade (DFT), concluindo que esse processo ocorre em várias etapas (Esquema 4): 1° - a histidina da segunda esfera de coordenação abstrai o próton do substrato; 2° - forma-se uma ligação de hidrogênio entre esta histidina protonada e o

oxigênio distal do superóxido; 3° a interação de hidrogênio passa a ocorrer com o outro oxigênio do superóxido; e 4° o oxigênio distal ataca o carbono C2 do substrato e o outro oxigênio se liga covalentemente ao hidrogênio.



Esquema 4: Mecanismo proposto por Christian e colaboradores (2012) para a transferência de próton, na homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase, do substrato para o superóxido mediada pela histidina 200 (Adaptado de Liu et al., 2017).

Gorce e Lipscomb (2003) mostraram que a mutação do resíduo de histidina por uma fenilalanina na 2,3-HPCD faz com que a enzima deixe de clivar o 2,3-dihidroxibenzoato – um substrato não natural – como uma extradiol dioxigenase, passando a atuar como uma intradiol dioxigenase sem que isso ocorra com o substrato natural. Além do mais, foi observado que a variante era mais rapidamente inativada quando comparada a enzima nativa, o que sugere que este resíduo tem o papel de estabilizar o complexo $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ prevenindo que o radical superóxido, ao ser formado, se desprenda do centro metálico.

Essa hipótese é suportada por um trabalho desenvolvido por Emerson e colaboradores (2005) em que quatro mutantes (H200A, H200E, H200N e H200Q) da 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenase dependente de manganês foram avaliadas. A titulação das enzimas nativa e mutantes com o substrato 4-nitrocatecol, que é um cromóforo, evidenciou que este substrato ligou-se como diânion em todas as enzimas exceto naquela em que a histidina foi mutada para uma

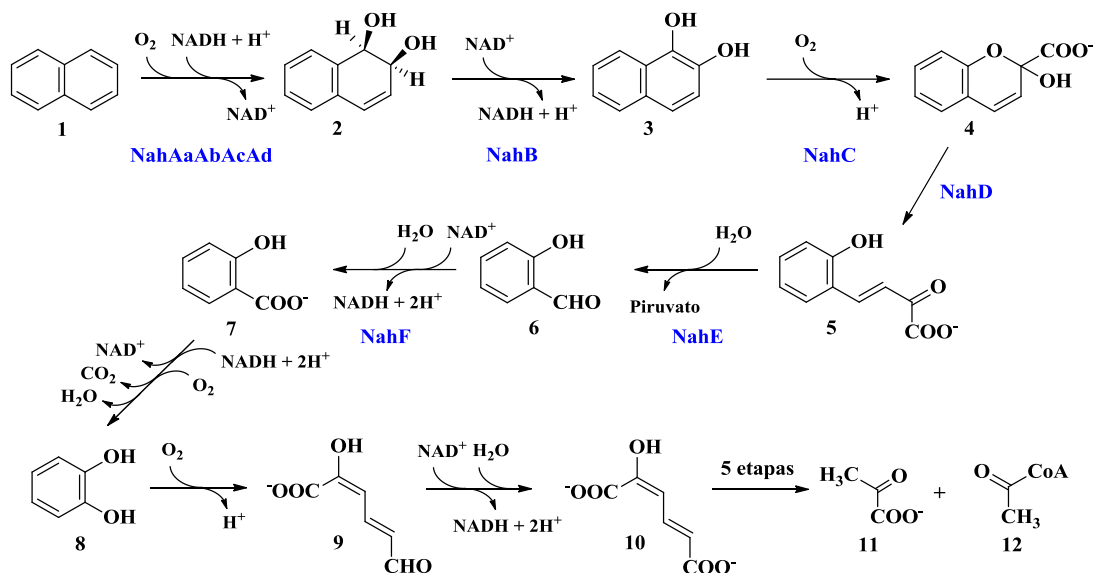
alanina. Isso significa que o mecanismo de desprotonação deste substrato foi perturbado devido à essa mutação na enzima. Mas, uma vez que outros resíduos poderiam desempenhar o papel de desprotonar o substrato como foi demonstrado no trabalho, isso não explicaria o motivo do resíduo de histidina ser conservado nas extradiol dioxigenases. Assim, os autores propõem que o papel da histidina seria realizar uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o radical superóxido, estabilizando os intermediários formados no processo catalítico.

Em outro trabalho Gorce e Lipscomb (2005) avaliaram a atividade de cinco enzimas que tiveram a histidina mutada por outro resíduo (H200A, H200Q, H200N, H200E e H200F). Foi observado que os valores de K_m para o substrato natural nas enzimas mutantes foram menores do que para enzima nativa. Isso sugere que as mutações não dificultam a formação do complexo de Michaelis. Além disso, os autores relatam que esse resíduo não tem o papel de promover a segunda desprotonação do substrato como é descrito em outros trabalhos e que essa função seria possivelmente desempenhada por uma molécula de solvente.

Diante disso, e sob a luz de trabalhos mais recentes, é possível inferir que mesmo que a histidina não seja essencial para a transferência de próton, a sua presença é capaz de auxiliar esse processo. Além disso, a interação de hidrogênio estabelecida entre esse resíduo e o oxigênio protonado estabiliza o intermediário favorecendo a catálise (Kovaleva et al., 2015; Meier et al., 2015).

1.4 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase

Bactérias do gênero *Pseudomonas* codificam enzimas que catalisam a conversão do naftaleno em piruvato e acetil coenzima A. O processo envolve duas vias conhecidas como superior e inferior (Esquema 5) (Kanaly, & Harayama, 2000; van Hamme, Singh, & Ward, 2003). Como é o caso das *Pseudomonas putida* da cepa G7, que possuem o plasmídeo NAH7 organizado em dois operons: o **nal** contendo os genes para as enzimas da via superior e o **sal** contendo os genes para as enzimas da via inferior (Simon et al., 1993). Na primeira o naftaleno (**1**) é convertido em salicilato (**7**) e piruvato. Já na segunda, a metabolização do salicilato rende mais um equivalente de piruvato (**11**) e acetil coenzima A (**12**). Cada qual dessas vias, superior e inferior, ocorre ao custo de dois equivalentes de dioxigênio, inseridos nos substratos alvos mediante a ação de cofatores enzimáticos.



Esquema 5: Via metabólica de degradação do naftaleno em bactérias do gênero *Pseudomonas*, com destaque para os genes responsáveis por codificar as enzimas responsáveis por catalisar as reações da via superior em *Pseudomonas putida* G7. Adaptado de Peng et al., (2008).

Entretanto, nem todas as *Pseudomonas* possuem as duas vias de degradação, este é o caso, por exemplo, das *Pseudomonas* sp. C18 que possuem o operon **dox** que contém os genes responsáveis por decodificar as enzimas utilizadas para a transformação do naftaleno em salicilato. E apesar dessas bactérias poderem utilizar o naftaleno como única fonte de carbono, diferentemente das *Pseudomonas putida* G7, não possuem os genes da via inferior, responsáveis por codificar as enzimas capazes de converter o salicilato em piruvato (Denome, Stanley, Olson, & Young, 1993).

A 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (1,2-DHNDO) é a terceira enzima da via superior de degradação do naftaleno (Esquema 5), sendo uma extradiol dioxigenase responsável por converter o 1,2-dihidroxi-naftaleno em 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato. Na via inferior, a catecol 2,3-dioxigenase catalisa similarmente a oxidação do catecol (Kobayashi et al., 1995). O interesse na 1,2-DHNDO deve-se, principalmente, a sua elevada promiscuidade na seleção dos substratos em relação às enzimas da via inferior que são altamente específicas (Cao, Nagarajan, & Loh, 2009). A razão biológica para isso é desconhecida, mas, na prática, por serem menos dependentes a variações estruturais no substrato em relação às enzimas da via inferior, acabam por oferecer um espectro mais amplo para aplicações futuras em biocatálise.

A capacidade de algumas extradiol dioxigenases em converterem preferencialmente substratos monocíclicos deve-se ao fato de possuírem um sítio ativo pouco volumoso (Vaillancourt

et al., 2005). Entretanto, além de resíduos específicos, outras duas regiões dessas enzimas estão estritamente relacionadas a primazia da seleção do substrato: A extremidade carboxi-terminal dobra-se sobre o sítio ativo, sendo que sua extensão e dinâmica afetam a entrada do substrato dentro da cavidade; uma região conhecida como grampo β que fica próxima ao sítio catalítico também afeta a ligação do substrato. Ademais, a dinâmica e possíveis interações estabelecidas de resíduos dessas regiões explicam o motivo de algumas dessas enzimas serem mais facilmente inativadas do que outras (Cho et al., 2009; Cho et al., 2010).

A 1,2-DHNDO de *Pseudomonas* sp. C18 (DoxG)¹, possui 97,4 % de identidade estrutural com a equivalente de *Pseudomonas putida* G7 (NahC) (Denome et al., 1993). A DoxG é uma enzima estratégica dado as suas características que permitem que ela clive diferentes substratos como o 2,3-dihidroxibifenil, o 3,4-dihidroxibifenil, 2,2',5,5'-tetracloro-3,4-dihidroxibifenil, além do 1,2-dihidroxi-naftaleno (Barriault, Durand, Maaroufi, Eltis, & Sylvestre, 1998). Estratégias bem-sucedidas de tornar este catalisador ainda mais eficiente foram conduzidas por Fortin e colaboradores (2005a), que conseguiram aumentar a especificidade desta para clivar 3,4-DHBs. Tais artificios representam importantes contribuições para a biorremediação de BPCs.

Estruturas elucidadas em alta resolução ($< 1,9 \text{ \AA}$) estão disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) e mostram que a DoxG ocorre como um octâmero (Figura 3a). A Figura 3b apresenta detalhes do sítio ativo, mostrando os seis resíduos conservados nas extradiol dioxigenases, das formas não-ligada (PDB ID 2EI2) e ligada ao 1,2-dihidroxi-naftaleno (PDB ID 2EI1).

¹ Neste trabalho, a sigla 1,2-DHNDO é utilizada para se referir à 1,2-dihidroxi-naftaleno de modo geral, independente do organismo, enquanto a sigla DoxG é usada para se referir a 1,2-DHNDO de *Pseudomonas* sp. C18.

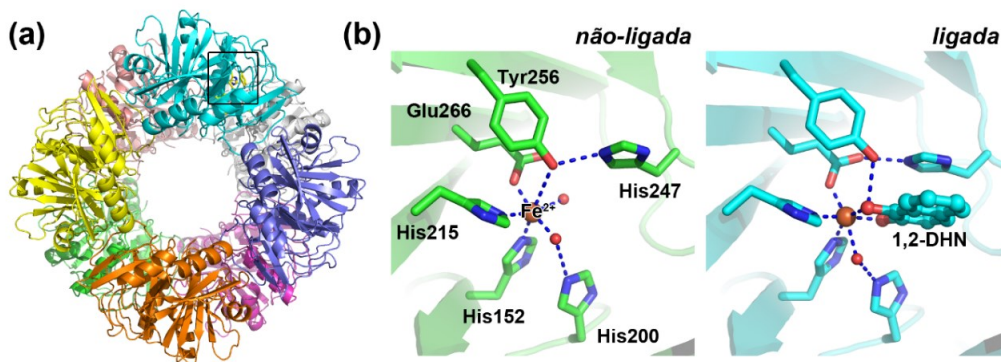


Figura 3: Estruturas de raios-X da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxygenase (DoxG). (a) representação da estrutura octamérica. O quadrado indica a posição das regiões indicadas em (b) para as formas não-ligada (PDB ID 2EI2) e ligada ao 1,2-dihidroxi-naftaleno (1,2-DHN) (PDB ID 2EI1).

A alta promiscuidade dessa enzima é explicada por estudos cristalográficos que evidenciam que o substrato natural da DoxG talvez não seja o DHN, isso porque, o sítio ativo volumoso dessa enzima seria capaz de acomodar catecóis ainda maiores (Neau, 2004).

Se por um lado o fato dessas enzimas promiscuas permitir que possam atuar para uma gama de substratos. Por outro, são mais facilmente inativadas por dioxigênio durante os processos de purificação e armazenamento ou ainda quando são utilizadas para conversão de substratos que possuem baixa especificidade (Cho et al., 2010; Vaillancourt et al., 1998; Vaillancourt et al., 2002b).

Contudo, extradiol dioxygenases que perderam a atividade pela oxidação do centro metálico podem ser reativadas pela incubação da enzima com agentes redutores e/ou solução contendo íons ferrosos. No entanto, dois fatores dificultam a aplicação dessa metodologia: (i) o melhor protocolo de reativação depende da natureza da enzima e das condições em que ela foi obtida (Cerdan et al., 1994; Takemori et al., 1968; Takemori, Komiyama, & Katagiri, 1971); (ii) embora se saiba que fatores como pH, concentração de íons Fe^{+2} e tempo de incubação, são capazes de influenciar na recuperação da atividade catalítica e diversos trabalhos mostrem como diferentes condições resultam em diferentes aumentos de atividade, pouco é discutido sobre os mecanismos envolvidos neste processo.

Ademais, do ponto de vista prático, para que um processo de catálise enzimática possa ser empregado com eficiência, estratégias que visem a obtenção de formas mais estáveis das enzimas

precisam ser desenvolvidas (Hatta, Mukerjee-Dhar, Damborsky, Kiyohara, & Kimbara, 2003; Reetz, 2013).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visa a obtenção da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) em condições aeróbicas e o desenvolvimento de estratégias para aprimorar sua estabilidade e atividade catalítica, principalmente, no que refere aos fatores que influenciam a reconstituição da holoenzima através da ligação do Fe^{+2} a enzima inativa. Visando alcançar esses objetivos, destacam-se os seguintes *objetivos específicos*:

- (i) Expressão da DoxG (nativa) em meio LB e mínimo (M9) suplementado com excesso de Fe^{+2} ou Mn^{+2} ;
- (ii) Purificação das enzimas até homogeneidade utilizando troca-iônica e cromatografia por exclusão de tamanho e caracterização por eletroforese em gel (SDS-PAGE);
- (iii) Cálculo da concentração de proteína e de íons metálicos incorporados durante as diferentes condições de expressão e purificação via teste de Bradford e espectroscopia de fluorescência de raios-X por reflexão total, respectivamente;
- (iv) Avaliação do estado oligomérico em solução da proteína por espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*);
- (v) Avaliação do efeito do pH, concentração de cátions de ferro bivalente, tempo de incubação e presença de outros sais no processo de recuperação da atividade catalítica da enzima;
- (vi) Avaliação da atividade enzimática da 1,2-dihidroxi-naftaleno na conversão dos substratos catecol, 3-metilcatecol e bifênil-2,3-diol;
- (vii) Avaliação da conversão do 3-metilcatecol sob a influência de tolueno no meio reacional;
- (viii) Avaliação da estabilidade térmica das enzimas via estudos cinéticos.

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.

3.2 Extração do DNA plasmidial

O plasmídeo contendo os genes que codificam a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) foi gentilmente cedido para o nosso grupo de pesquisa pelo professor Lindsay David Eltis (Departamento de Microbiologia e Bioquímica, Universidade da Colúmbia Britânica, Canadá) – pesquisador responsável pela coordenação do grupo responsável por obter a enzima nativa e variantes (Fortin et al., 2005a). O vetor de expressão estava contido em *Escherichia coli* DH5α em meio sólido LB ágar.

Para propagação do DNA, a cultura de DH5α contendo o plasmídeo de interesse foi transferida do meio sólido para 10 mL de meio LB líquido (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; e cloreto de sódio 10 g/L) contendo ampicilina 100 µg/mL – antibiótico cujas cepas contendo o vetor de expressão são resistentes – que foi submetido a agitação a 200 rpm em uma estufa a 37 °C por 16 h.

A partir da cultura de células cultivadas em meio LB, conforme descrito anteriormente, foi feita a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep da marca Promega seguindo as instruções descritas no manual de operação do kit, para que, posteriormente, este plasmídeo pudesse ser utilizado na transformação de *E. Coli* BL21(DE3) competentes.

3.3 Transformação de células por eletroporação

As bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3) eletrocompetentes foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Estrutural BIOEST (Prof. Ronaldo Nagem) do ICB/UFMG. A transformação das células foi realizada no eletroporador MicroPulser™, da marca Bio-Rad – seguindo o protocolo presente no manual do equipamento – conforme descrito a seguir:

As células eletrocompetentes e a cubeta para eletroporação de 0,2 cm foram mantidas no gelo por cerca de 5 minutos. Em seguida, 2 µL do plasmídeo obtido após uma MiniPrep foi

adicionado à cultura de bactérias e o material foi incubado em gelo por mais 1 minuto. Na sequência, este foi transferido para a cubeta de eletroporação que foi submetida a um pulso elétrico de 2,5 kV. Imediatamente após a eletroporação, foi acrescentado às células 800 µL de meio LB líquido a temperatura ambiente. Esta cultura foi incubada a 37 °C durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. Após este processo, o material foi centrifugado a 1500 g por 5 min em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuspensionado em 100 µL de meio LB líquido. Todo o conteúdo foi adicionado a uma placa de LB Agar (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 10 g/L; e ágar 15 g/L) contendo o antibiótico para o qual o vetor apresenta resistência. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C durante 16 h.

Após a incubação foi feito um pré-inóculo transferindo-se uma colônia do meio sólido para 20 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL. A cultura foi mantida em uma estufa a 37 °C e sob agitação de 200 rpm por 16 h. Visando conservar as culturas em meio líquido, várias alíquotas de 1 mL foram preparadas mediante a mistura de 250 µL de glicerol 80% com 250 µL de meio LB e 500 µL do meio de cultura obtido a partir do crescimento bacteriano no pré-inóculo. Essas amostras foram preparadas em tubos de microcentrífuga de 1 mL. Algumas amostras foram armazenadas a -20 °C para pronto uso e outras a -80 °C para uso futuro.

3.4 Expressão heteróloga da proteína DoxG em células cultivadas em meio LB

Um inóculo foi preparado pela adição de 200 µL das bactérias BL21(DE3), contendo o plasmídeo que possui o gene DoxG, a 20 mL de meio LB líquido. A esse meio foi adicionado 20 µL de ampicilina 100 mg/L. O pré-inóculo foi incubado a 37 °C por 16 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm.

O inóculo foi transferido para 1 L de meio LB líquido e, a este, foi adicionado ampicilina para uma concentração final de 100 µg/mL e 1 mL de uma solução contendo uma mistura de sais levando o meio a possuir as seguintes concentrações dos mesmos: MgCl₂ 14,1 mM, CaCO₃ 2,5 mM, FeSO₄ 4,27 mM, ZnSO₄.7H₂O 0,625 mM, MnSO₄ 0,625 mM, CuSO₄.5H₂O 0,125 mM, CoCl₂.5H₂O 0,125 mM, H₃BO₃ 0,125 mM, MgSO₄ 262,5 mM e CaCl₂ 10 mM.

As células foram cultivadas sob agitação de 200 rpm a 37 °C, tendo o crescimento sido monitorado por espectrofotometria até a cultura alcançar a densidade óptica de 0,7 U.A. em 600 nm; aproximadamente 5 h. Neste momento, o indutor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) foi adicionado ao meio para uma concentração final de 0,30 mM. Antes da adição do IPTG foi

coletada amostra para análise em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Após a indução, o meio de cultura foi mantido a 18 °C sob agitação de 200 rpm por 16 h e uma amostra foi coletada para posterior análise por gel de poliacrilamida desnaturante. O meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm por 60 minutos a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano estocado a -20 °C.

3.5 Expressão heteróloga da proteína DoxG em células cultivadas em meio mínimo M9

O inóculo foi feito da mesma forma como descrito para expressão da proteína em meio LB. Contudo, para preparar o meio de cultivo, o inóculo foi centrifugado a 2500 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano resultante foi resuspendido em 5 mL de meio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 33,7 mM, KH₂PO₄ 22,0 mM, NaCl 8,55 mM, NH₄Cl 9,35 mM, glucose 0,4% m/v, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,3 mM, tiamina 1 µg/L, pH 7,2). Em seguida a mistura foi transferida para 1 L de meio mínimo M9. A este, foi adicionado 1 mL de ampicilina 100 mg/mL e 1 mL de uma solução contendo mistura de sais levando o meio possuir as seguintes concentrações dos mesmos: MgCl₂ 14,1 mM, CaCO₃ 2,5 mM, FeSO₄ 4,27 mM, ZnSO₄.7H₂O 0,625 mM, MnSO₄ 0,625 mM, CuSO₄.5H₂O 0,12 5mM, CoCl₂.5H₂O 0,125 mM, H₃BO₃ 0,125 mM, MgSO₄ 262,5 mM e CaCl₂ 10 mM. Além disso, o meio foi suplementado com solução de MnCl₂ (30 mg/L ou 90 mg/L) ou FeSO₄ (30 mg/L) com o objetivo de se obter enzimas com diferentes concentrações finais dos cátions Mn⁺² e Fe⁺².

As células foram cultivadas sob agitação de 200 rpm a 37 °C, tendo o crescimento sido monitorado por espectrofotometria até a cultura alcançar uma leitura de densidade óptica de 0,7 A.U. em 600 nm; aproximadamente 10 h. Neste momento, o indutor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) foi adicionado ao meio para uma concentração final de 0,30 mM. Após a indução, o meio de cultura foi mantido a 18 °C sob agitação de 200 rpm por 16 h. O meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm e 4 °C por 60 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano guardado a -20 °C. Foram coletadas amostras para análise em gel de poliacrilamida desnaturante tanto antes da adição do IPTG e quanto ao final logo antes da centrifugação.

3.6 Lise de bactérias

O sedimento bacteriano contendo a proteína recombinante foi ressuscitado no tampão de lise celular (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, álcool *terc*-butílico 10% v/v, sulfato de amônio 33 mM, ditioneitol 2 mM, pH 7,5) e foi submetido a três ciclos de congelamento-descongelamento utilizando nitrogênio líquido. Em seguida a lise foi completada com ultrassom de alta intensidade com amplitude de 30%, com três ciclos com intervalo de 90 segundos entre si, sendo cada ciclo constituído de 3 pulsos de 30 segundos ligado com intervalo de 30 segundos desligado. Durante todo esse procedimento a mistura foi mantida em um frasco imerso em um banho de gelo.

Após centrifugar a mistura a 12000 rpm e a 4 °C por 40 minutos o sobrenadante foi filtrado e utilizado imediatamente nas etapas posteriores da purificação.

3.7 Purificação das proteínas recombinantes

As purificações das proteínas recombinantes foram realizadas com um equipamento ÄKTA™ start. Este processo foi realizado utilizando duas técnicas cromatográficas distintas conforme descrito por Vaillancourt e colaboradores (1998): a primeira consistiu na cromatografia de troca iônica e a segunda na cromatografia de exclusão molecular.

Aproximadamente 15 mL do extrato obtido no processo de lise celular foi injetado, em um fluxo de 1,5 mL/min, em uma coluna HiTrap™ mono Q 5 mL previamente equilibrada com o tampão A (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, álcool *terc*-butílico 10% v/v, cloreto de sódio 150 mM, ditioneitol 2 mM, pH 7,5). Um gradiente linear foi construído aumentando-se a concentração do tampão B (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, álcool *terc*-butílico 10% v/v, cloreto de sódio 400 mM, ditioneitol 2 mM, pH 7,5) de 0 a 100%, aumentando desta forma a força iônica da fase móvel. A coluna foi operada a um fluxo de 2 mL/min durante o processo. Em alguns processos, visando avaliar se os cátions bivalentes de manganês poderiam fornecer proteção a enzima, MnCl₂ foi adicionado aos tampões A e B para uma concentração final de 0,6 mM.

As frações contendo atividade – clivavam o 3-metilcatecol – ou que apresentavam a banda característica da DoxG no gel de poliacrilamida SDS-PAGE foram concentradas por ultracentrifugação com um Vivaspín™ 20 (GE Healthcare) para um volume final de aproximadamente 5 mL. Na sequência, essa amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) previamente

equilibrada com o tampão C (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, álcool *terc*-butílico 10% v/v, sulfato de amônio 33 mM, ditioneitol 2 mM, pH 7,5). Novamente, as frações contendo atividade ou que apresentavam a banda característica da DoxG no gel de poliacrilamida SDS-PAGE foram concentradas e diluídas com glicerol para uma concentração final 10% v/v. Por fim, as proteínas purificadas foram separadas em alíquotas (0,250 mL) e armazenadas a -20 °C ou -80 °C.

Todo o processo de lise e purificação foi conduzido mantendo as soluções e extratos a temperaturas inferiores a 4 °C. Em alguns casos nitrogênio gasoso foi borbulhado dentro dos tampões por 5 minutos visando remover o dióxigênio das soluções.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Na preparação das amostras retiradas dos meios de cultura, 1 mL foi coletado e centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento bacteriano foi ressuspendido em 300 µL do tampão de amostra para eletroforese (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, álcool *terc*-butílico 10% v/v, sulfato de amônio 33 mM, ditioneitol 2 mM, pH 7,5). A lise das células foi realizada por extrusão em uma seringa de calibre 0,7 mm 20 vezes. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A 30 µL do sobrenadante ou do sedimento foi adicionado 10 µL de tampão de desnaturação (200 mM Tris-HCl pH 6,8, ditioneitol 400 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 8% m/v, azul de bromofenol 0,4% m/v, glicerol 40% v/v). No caso das amostras coletadas durante as etapas da purificação, após serem diluídas no tampão de amostra para eletroforese, foi adicionado o tampão de desnaturação levando a concentração final de seus constituintes similares àquelas no preparo das amostras coletadas dos meios de cultura.

As amostras coletadas em cada passo do processo de expressão e purificação foram diluídas no tampão de amostra para eletroforese. As amostras e o padrão de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker – Thermo Scientific Pierce, foram submetidos à eletroforese na cuba de eletroforese vertical LCV-10×10 da Locus com gel de empilhamento contendo um gradiente contínuo de 6% de poliacrilamida/bis-acrilamida e o gel de separação contendo 15% deste polímero em sua composição. A eletroforese foi conduzida com a voltagem constante de 180 V durante a passagem da amostra pelo gel de empilhamento e 200 V durante a passagem pelo gel de separação.

Para visualização das bandas, os géis foram imersos e aquecidos por 30 segundos em uma solução corante (0,5% Coomassie Blue R-250, 10% ácido acético, 50% etanol) em um micro-ondas na potência máxima. Em seguida, eles foram mantidos sob agitação a 60 rpm por 10 minutos. Os géis foram descorados aquecendo-os em água destilada no micro-ondas. A água foi trocada à medida que com o corante era removido. Este processo foi feito até a revelação das bandas proteicas e o descoramento das regiões do gel que não apresentavam proteínas.

3.9 Cálculo da concentração de proteínas pelo método de Bradford

O reagente de Bradford correspondeu a uma solução contendo 50,0 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50,0 mL metanol, que foi diluída com 100,0 mL de ácido fosfórico 85% PA e água destilada para o volume final de 1,0 L. Antes de cada experimento, essa solução foi filtrada em papel Whatman nº 1. Na construção da curva padrão, várias soluções de concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA) foram preparadas a partir de uma solução estoque (2,0 g/L). Antes de cada experimento a concentração da solução estoque de BSA foi aferida por espectrofotometria no comprimento de onda 280 nm ($\epsilon = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), aplicando a Lei de Lambert-Beer (Coligan et al., 1996).

O preparo das amostras para análise foi feito da seguinte forma: adicionou-se 3,0 mL do reagente de Bradford a um tubo de plástico e em seguida 60 μL do padrão (solução de BSA), do branco (água destilada) ou da amostra (proteína de interesse). Estas foram incubadas por no mínimo 5 minutos e por não mais do que 1 hora a temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 595 nm e os dados foram utilizados para construção da curva padrão e para o cálculo da concentração de proteína da amostra.

3.10 Cálculo da concentração de metais nas amostras de proteínas utilizando fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

As amostras foram inicialmente diluídas: 100 μL de amostra foi colocada em um tubo de microcentrífuga juntamente com 275 μL de água deionizada Milli-Q® e 125 μL de um padrão interno de gálio 10 mg/L. O branco foi feito substituindo-se a amostra pelo tampão C. As amostras foram submetidas a agitação no agitador de tubos Vortex.

Na sequência, 10 μL da amostra foi colocada sobre o disco de quartzo. Uma estufa contendo uma lâmpada incandescente foi utilizada para evaporar o solvente. Após a completa evaporação do solvente e a formação de um filme fino, procedeu-se a análise de fluorescência de

raios X por reflexão total (TXRF) no S2 PICOFOX (Bruker). O difratômetro foi equipado com tubo Mo K α 17,5 keV e operado a 600 μ A, 50 kV e 50 W, sendo que o tempo de aquisição foi de 500 s por amostra. A partir dos espectros obtidos analisou-se a porcentagem de dos metais incorporados pela enzima a partir de dos diferentes processos de preparação.

3.11 Espalhamento dinâmico de luz

As amostras proteicas foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C para retirar impurezas ou partículas insolúveis presentes em suspensão. Na sequência, os ensaios de espalhamento dinâmico de luz (EDL) foram realizados utilizando o equipamento ZETASIZER nano ZS[®] (Malvern) na temperatura de 10 °C utilizando cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 mL e quatro faces polidas foram utilizadas para amostras nas concentrações de 0,14 mM e 0,07 mM, sendo que cada medida teve duração de 60 segundos. Para determinação do estado oligomérico da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase em solução os dados de raio hidrodinâmico (Rh) da partícula foram comparados com os dados cristalográficos disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) e com cálculos feitos no *software* Hullrad (Fleming, & Flaming, 2018).

3.12 Ensaios de atividade enzimática

As reações enzimáticas foram acompanhadas via espectroscopia UV-Vis utilizando-se o equipamento da marca Varian modelo Cary 50 interfaciado com o programa CarywinUV acoplado a um banho termostático da marca Polyscience modelo 9106 com precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. As reações foram realizadas a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ em cubetas de quartzo com capacidade de 1,4 mL (1 mL de solução) em tampão de fosfato de sódio 100 mM pH 6,5 – para um dos substratos a reação também foi feita em pH 7,0 – iniciadas a partir da adição de enzima ao meio reacional com auxílio de um add-mixer. A atividade específica da enzima (U/mg) foi determinada a partir da Equação 4 que é a razão entre a velocidade inicial (v_o), medida através da variação da concentração de produto em função do tempo (Eq. 1) e a concentração de enzima utilizada no experimento conforme descrito abaixo (Harris, & Keshwani, in Burgess, & Deutscher, 2009):

$$v = \frac{d[P]}{dt} \quad (1)$$

Como a absorvância do produto está diretamente relacionada com sua concentração conforme a Lei de Lambert-Beer ($c = A/\epsilon l$), assim, a Equação 1 pode ser reescrita como:

$$v = \frac{d\left[\frac{A}{\epsilon l}\right]}{dt} \quad (2)$$

Dividindo-se a Equação 2 pela concentração de enzima $[E_0]$ temos a atividade específica ($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ou U/mg):

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{\left(\frac{d[A]}{dt}, \text{min}^{-1}\right)}{(\epsilon, \text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})(l, \text{cm})([E_0], \text{mg mL}^{-1})} \quad (3)$$

Como a variação da absorbância em função do tempo é dada pelo coeficiente angular nos primeiros 5-10% de reação, temos que:

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{(\text{coef. ang.}, \text{min}^{-1})}{(\epsilon, \text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})(l, \text{cm})([E_0], \text{mg mL}^{-1})} \quad (4)$$

3.12.1 Experimentos de reativação da DoxG

Nos ensaios de reativação, a atividade enzimática foi avaliada analisando-se sua capacidade de clivar o substrato 3-metilcatecol na concentração de 0,2 mM. A formação do produto foi monitorada a 320 nm utilizando uma absorptividade molar (ϵ) igual a $13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Patel, & Barnsley, 1980). Todos os tampões utilizados no processo de reativação continham 5% v/v de álcool *terc*-butílico. As amostras de enzimas, durante o período de reativação, foram mantidas em banho de gelo.

Para determinar o pH ótimo para a reativação, a enzima foi incubada na concentração de 0,854 g/L por diferentes tempos em diferentes pHs na presença de 0,3 mM de sulfato ferroso e 1 mM de ácido ascórbico. Os tampões encontravam-se na concentração de 50 mM. Nos pHs 2 e 3 foi usado o H_3PO_4 , 4 até 6 o ácido acético/acetato e de 6,5 até 8 o NaH_2PO_4 . Após o período de incubação, uma alíquota da enzima foi adicionada ao meio reacional – para uma concentração final de 17,08 mg/L – avaliando-se a atividade específica para a conversão do substrato conforme descrito anteriormente.

No caso da avaliação da concentração de íons ferrosos a enzima foi reativada em tampão preparado com ácido acético/acetato para o pH 5,75 com concentrações de sulfato ferroso que variavam de 0 a 1,0 mM. Além disso, as soluções continham 1,0 mM de ácido ascórbico. A enzima foi incubada por 40 minutos antes de se testar sua atividade. Uma vez determinado o efeito da concentração de ferro, deu-se a avaliação da influência do tempo de incubação, em que a enzima foi reativada em tampão ácido acético/acetato pH 5,75 com concentração de sulfato ferroso igual

a 0,5 mM contendo 1,0 mM de ácido ascórbico. A enzima foi mantida na solução reativante por tempos que variaram entre 5 e 250 minutos antes do ensaio de cinética. Nesses experimentos a enzima foi incubada em uma concentração de 0,854 g/L e no teste de atividade a concentração foi de 8,54 mg/L.

Para determinar se outros sais poderiam influenciar na extensão do processo de reativação os compostos NaCl, KCl e Na₂SO₄ foram adicionados a solução de reativação para concentrações finais entre 0 e 80 mM. Os demais componentes da solução foram os mesmos descritos na determinação do melhor tempo de reativação. A concentração de enzima na solução de incubação foi de 1,33 g/L e na cinética de 26,6 mg/L.

3.12.2 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten: K_m e k_{cat}

Após determinar uma condição ideal para reativar a DoxG, avaliou-se a variação da atividade específica em função da concentração inicial de substrato no meio reacional. Os parâmetros K_m e k_{cat} foram determinados com a Equação de Michaelis-Menten (Equação 5). Esses parâmetros foram determinados em pH 6,5 monitorando-se a formação do produto de clivagem em 320 nm ($\epsilon = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o 3-metilcatecol (Patel, & Barnsley, 1980), 375 nm ($\epsilon = 22598 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o catecol (Nakai et al., 1983) e 434 nm ($\epsilon = 6100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para o 2,3-dihidroxibifenil (Catelani, & Colombi, 1974; Eltis et al., 1993; Fortin et al., 2005a) e em pH = 7,0 monitorando-se a formação do produto de clivagem do 2,3-dihidroxibifenil em 434 nm ($\epsilon = 11000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fortin et al., 2005b), sendo que as concentrações de enzima nos ensaios variaram entre de 0,200 μM a 1,53 μM .

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{k_{cat}[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

3.12.3 Inativação térmica

As enzimas contendo ferro e manganês foram submetidas ao estudo de inativação térmica no qual após serem mantidas na solução de reativação (tampão ácido acético/acetato 50 mM pH 5,75 contendo 0,5 mM de FeSO₄ e 1,0 mM de ácido ascórbico) por 150 minutos foram transferidas para um banho termostático nas temperaturas de 40, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por diferentes intervalos de tempo. Na sequência a atividade da enzima foi testada para a conversão do 3-metilcatecol na mesma condição descrita no estudo de reativação.

Visando avaliar se o manganês poderia fornecer uma maior proteção a inativação térmica, a enzima obtida em meio mínimo suplementado com excesso de íons ferrosos foi incubada com 1,0 mM de cloreto de manganês e sua atividade foi comparada com a enzima obtida nessas mesmas condições, mas incubada na ausência de cátions de manganês bivalente.

As concentrações de enzima utilizadas nos experimentos foram 1,59 g/L na reativação e 15,9 mg/L na cinética para a enzima expressa em meio mínimo suplementado com excesso de ferro, já para a enzima em meio suplementado com excesso de manganês e purificada com tampão de força iônica contendo MnCl_2 0,6 mM as concentrações foram de 1,33 g/L na reativação e de 13,3 mg/L na cinética.

3.12.4 Efeito da adição de tolueno e sulfato de sódio (Na_2SO_4) na atividade enzimática

Os ensaios que avaliam se o tolueno poderia auxiliar como um co-substrato para aumentar a eficiência catalítica na conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM) ou prevenir a inibição suicida provocada por este substrato foram conduzidos com a enzima reativada, que correspondeu a mesma condição descrita no experimento de inativação térmica. Além do substrato 0,2 mM, a mistura foi preparada de modo a conter concentrações crescentes de tolueno. Nesse experimento, a concentração de enzima na solução de reativação era de 0,472 g/L e na cinética de 4,72 mg/L.

Já nos estudos visando avaliar se o sulfato de sódio poderia influenciar na atividade enzimática. A enzima foi reativada como descrito anteriormente, mas o tampão de cinética foi preparado de modo a conter concentrações crescentes de sulfato de sódio entre 0 e 160 μM deste sal. Além disso, neste ensaio a atividade enzimática foi medida não apenas para o substrato na concentração de 200 μM , mas também nas concentrações de 50 e 400 μM . Na reativação, a concentração da enzima era de 0,728 g/L e na cinética de 14,56 mg/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Basicamente, esta seção foi dividida nas seguintes partes:

1. Descrição dos procedimentos de expressão e purificação na obtenção da DoxG em condições aeróbias e determinação do estado oligomérico e a massa molecular das unidades monoméricas.
2. Estabelecimento de um protocolo e discussão dos diferentes fatores que afetam a reativação da DoxG (pH, efeito do tampão, concentração de cofator, presença de sais e tempo de incubação) e avaliação da possibilidade de substituir o cofator Fe^{2+} por Mn^{2+} .
3. Avaliação da termoestabilidade da DoxG conferida pelo uso de Mn^{2+} e da relação entre a quantidade de Mn^{2+} presentes nas amostras de enzimas obtidas em diferentes condições com sua atividade específica.
4. Obtenção dos parâmetros de Michaelis–Menten para a clivagem do catecol, 3-metilcatecol e 2,3-dihidroxibifenil para avaliar o reconhecimento de substratos pela DoxG.

4.1 Expressão e Purificação

As expressões da DoxG foram realizadas em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Em meio Luria-Bertani (LB) houve um rendimento médio de 5 gramas de sedimento celular por litro de meio de cultura, enquanto em meio mínimo M9 suplementado com cátions bivalentes de ferro ou manganês o rendimento foi inferior, com cerca de 3 gramas de sedimento celular por cada litro de cultura. Após a obtenção do sedimento celular, conforme descrito na seção de materiais e métodos, as células foram submetidas a lise imediatamente ou armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

A purificação da DoxG seguiu o protocolo modificado em relação ao descrito no trabalho de Fortin e colaboradores (2005a). Visto que no presente trabalho a enzima foi purificada em condições aeróbicas, os tampões de purificação foram preparados conforme descrito no trabalho de Vaillancourt e colaboradores (1998), que descreve a purificação da 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase. Aos tampões de eluição, em vez de 10% de glicerol, adicionou-se 10% de álcool *terc*-butílico. A utilização deste composto se justifica pelo fato de que ele é capaz de se complexar ao cofator dificultando o contato entre o ferro e o dioxigênio, sendo assim capaz de proteger a enzima da oxidação (Vaillancourt et al., 1998). Outro composto utilizado na preservação da enzima foi o ditioneitol (DTT), que além de evitar a formação de ligação dissulfeto, é um agente redutor (Walker, 2002).

A DoxG foi purificada à homogeneidade utilizando duas etapas cromatográficas. Na Figura 4 tem-se o cromatograma para a purificação na coluna de troca iônica. A proteína foi eluída a 2 mL/min com um gradiente linear de cloreto de sódio de 150 no tampão A à 400 mM no tampão B. Observou-se que a proteína geralmente era eluída quando a mistura apresentava em torno de 50% de cada um dos tampões. No caso das enzimas em que foi adicionado MnCl_2 0,6 mM aos tampões A e B não foi observado grandes mudanças no perfil cromatográfico. Frações de 8 mL foram coletadas, e a identidade da proteína foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE ou medindo-se a atividade para a conversão do 3-metilcatecol pela enzima.

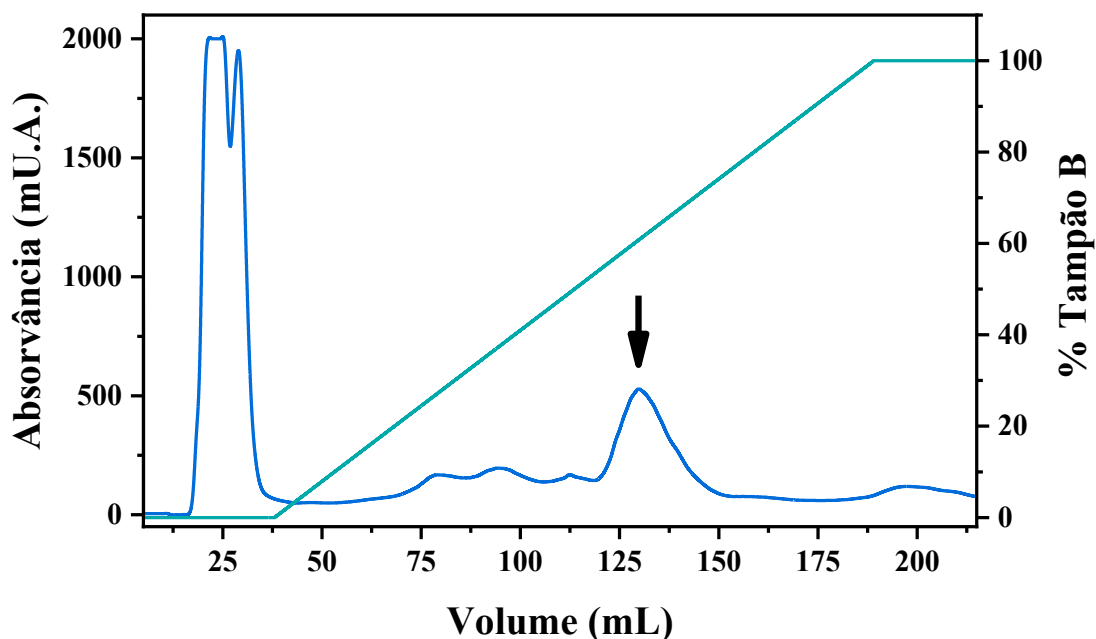


Figura 4: Perfil cromatográfico de eluição da DoxG em coluna de troca iônica HiTrap™ mono Q 5 mL. A seta indica o pico correspondente à proteína de interesse. Eluída a 2 mL/min com um gradiente linear de 150 a 400 mM de cloreto de sódio em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo álcool terc-butílico 10% v/v e DTT 2 mM. A absorvância a 280 nm em mU.A. em função do volume de eluição em mL.

Após concentrar as frações para um volume de 5 mL, a proteína foi submetida a segunda etapa cromatográfica, agora em uma coluna de gel filtração apresentada na Figura 5. O sinal de maior intensidade em torno de 45 mL se refere a proteína de interesse. Visto que a DoxG possui uma massa molecular de 34 kDa, a eluição logo no início da purificação evidencia a formação de um estado oligomérico de alta massa molecular que interage pouco com a resina da coluna.

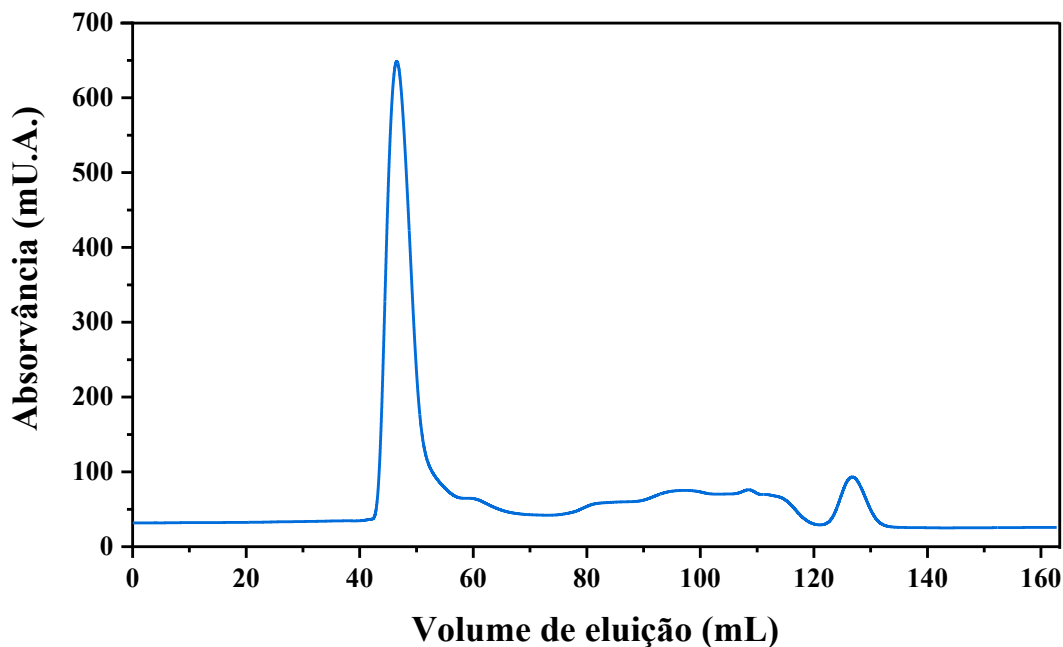


Figura 5: Perfil cromatográfico de eluição da DoxG em coluna de exclusão molecular HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade. Eluída a 0,8 mL/min com tampão Tris-HCl 10 mM contendo álcool terc-butílico 10% v/v, sulfato de amônio 33 mM e DTT 2 mM. A absorvância a 280 nm em mU.A. em função do volume de eluição em mL.

Para avaliar a pureza das enzimas obtidas e a sua massa monomérica, ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foram realizados (Figura 6a). A banda referente a DoxG encontra-se entre a banda de 37 kDa e 25 kDa em relação ao padrão utilizado. Ao plotar o logaritmo da massa molecular dos padrões de massa molecular conhecida em função de sua mobilidade eletroforética obtemos uma reta (Figura 6b). Considerando a faixa em que se observa linearidade, estimou-se uma massa de aproximadamente 31 kDa para uma subunidade da apoenzima, estando este valor próximo ao previsto, em que uma massa molecular de 34 kDa foi calculada a partir da sequência primária desta proteína (Tabela 1).

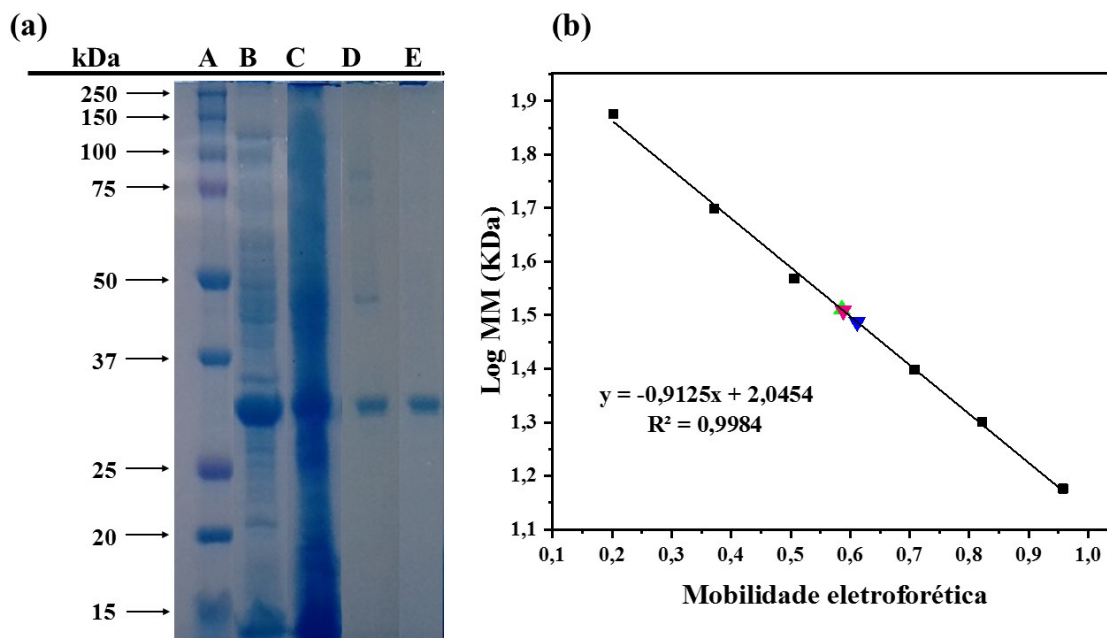


Figura 6: Perfil eletroforético da purificação da proteína DoxG. (a) SDS-PAGE 15% após coloração com Coomassie Blue. Canaleta: A – padrão contendo proteínas de massa conhecida, conforme indicado; B – lisado; C – sedimento do lisado; D – proteína após a coluna de troca iônica; E – proteína após cromatografia por exclusão molecular. (b) Logaritmo da massa molar conhecida (Canaleta A) em função da mobilidade eletroforética: os pontos marcados como triângulos coloridos referem-se a DoxG canaleta B, D e E e foram utilizados para estimar a massa da unidade monomérica.

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos para a DoxG.

MSKQAAVIEL	GYMGISVKDP	DAWKSFATDM	LGLQVLDEGE	KDRFYLRMDY	WHHRIVVHH	60
					N	
GQDDLEYLGW	RVAGKPEFEA	LGQKLIDAGY	KIRICDKVEA	QERMVLGLMK	TEDPGGNPTE	12
						0
IFWGPRIDMS	NPFHPGRPLH	GKFVTGDQGL	GHCIVRQTDV	AEAHKFYSLL	GFRGDVEYRI	18
						0
PLPNGMTAEL	SFMHCNARDH	SIAFGAMPAA	KRLNHLMLEY	THMEDLGYTH	QQFVKNEIDI	24
						0
ALQLGIHAND	KALTFYGATP	SGWLIPEGWR	GATAIDEAEY	YVGDIFGHGV	EATGYGLDV	30
					K	0
LS						

Fonte: NCBI GenBank: M60405.1.

Ao total foram obtidas 10 enzimas nas condições descritas no Quadro 1:

Quadro 1 - Código atribuído a enzima, meio utilizado para expressar e condição de purificação utilizada. As demais características utilizadas durante a expressão e purificação foram iguais para todas as enzimas e encontram-se descritas no texto.

Lote	Expressão	Purificação
LBDoxGwt1	Meio LB	Sem adicionar cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
LBDoxGwt2	Meio LB	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9FeDoxGwt1	Meio M9 suplementado com 30 mg/L de sulfato ferroso	Sem adicionar cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9FeDoxGwt2	Meio M9 suplementado com 30 mg/L de sulfato ferroso	Sem adicionar cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt1	Meio M9 suplementado com 30 mg/L de cloreto de manganês	Sem adicionar cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt2	Meio M9 suplementado com 90 mg/L de cloreto de manganês	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt3	Meio M9 suplementado com 90 mg/L de cloreto de manganês	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt4	Meio M9 suplementado com 90 mg/L de cloreto de manganês	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt5	Meio M9 suplementado com 90 mg/L de cloreto de manganês	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica
M9MnDoxGwt6	Meio M9 suplementado com 90 mg/L de cloreto de manganês	Com a adição de cloreto de manganês aos tampões usados na coluna de troca iônica

Nos estudos conduzidos por Kukm (1991) foi observado que a 1,2-DHND0 é mais estável em meio ligeiramente alcalino. Foi observado pelos autores que, após ser incubada por uma semana em tampão de fosfato pH 7,5 e temperatura de 4 °C, a atividade da enzima após ser reativada equivalia à atividade da enzima reativada logo após a purificação. No presente trabalho

não foi avaliado se a DoxG preservava a atividade por esse período nessas condições, entretanto o tampão de Tris pH 7,5 foi utilizado na purificação e armazenamento da enzima.

Em vez de manter a enzima a 4 °C, optou-se por congelar as amostras conforme descrito no trabalho de Fortin (2005a), que observou que a enzima poderia ser armazenada por seis meses a -80 °C sem perda significativa de atividade. Observamos que a atividade realmente se conserva por esse período de tempo mesmo quando a enzima é armazenada a -20 °C. Além do *t*-butanol, que já estava presente no tampão conforme descrito anteriormente, glicerol foi adicionado a enzima para uma concentração de 10% v/v visando garantir maior proteção a enzima em relação às condições de congelamento.

4.2 Cálculo da Concentração da Enzima pelo Método de Bradford

O método mais indicado para determinar precisamente a concentração de uma proteína baseia-se em medir sua absorvância via espectroscopia UV/Vis e a partir do coeficiente de extinção molar, conhecido ou determinado, usar a lei de Lambert-Beer para calcular a concentração da amostra de interesse (Grimsley, & Pace, 2004). No entanto, visto que a possibilidade de interações metal-ligante pode afetar a absorptividade molar da proteína (Noble, & Bailey, 2009), optamos pelo uso do método de Bradford conforme empregado anteriormente para essa proteína (Fortin, 2005c).

As concentrações das enzimas nos estoques encontram-se na Tabela 2 e as curvas de calibração utilizadas para analisar cada amostra encontra-se no Anexo 1.

Tabela 2 - Concentração das diferentes enzimas obtidas calculadas via o método de Bradford.

<i>Lote</i>	<i>Concentração (g/L)</i>	<i>Concentração (mmol/L)</i>
LBDoxGwt1	10,83	0,3126
LBDoxGwt2	14,64	0,4226
M9FeDoxGwt1	8,29	0,239
M9FeDoxGwt2	15,94	0,4601
M9MnDoxGwt1	15,71	0,4534
M9MnDoxGwt2	4,72	0,136
M9MnDoxGwt3	8,54	0,246
M9MnDoxGwt4	3,64	0,105
M9MnDoxGwt5	13,33	0,3848
M9MnDoxGwt6	1,89	0,0545

4.3 Determinação do Estado Oligomérico em Solução da DoxG

A massa molecular da 1,2-DHNDO – da cepa de *Pseudomonas* BN6 – foi determinada por Khum e colaboradores (1991) por gel filtração estimando-se um valor de 290 kDa, e como a massa de uma subunidade foi determinado por eletroforese em gel de SDS como sendo de aproximadamente 33 kDa, os autores chegaram à conclusão de que a enzima apresentava uma estrutura quaternária caracterizada por um complexo octamérico.

As estruturas cristalográficas obtidas por Neau (2004) para a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas* sp. C18 (PDB 2EI1) também sugerem a organização da enzima em um arranjo octamérico (Figura 7). Medidas de distância entre as extremidades da estrutura quaternária realizadas no *software* Chimera 1.13.1 retornaram um diâmetro médio de 100 Å. Além disso, uma simulação das propriedades hidrodinâmicas da enzima a partir desta mesma estrutura (PDB 2EI1) no *software* Hullrad (Fleming, & Fleming, 2018) previram um D_{\max} de 112,11 Å para essa partícula.

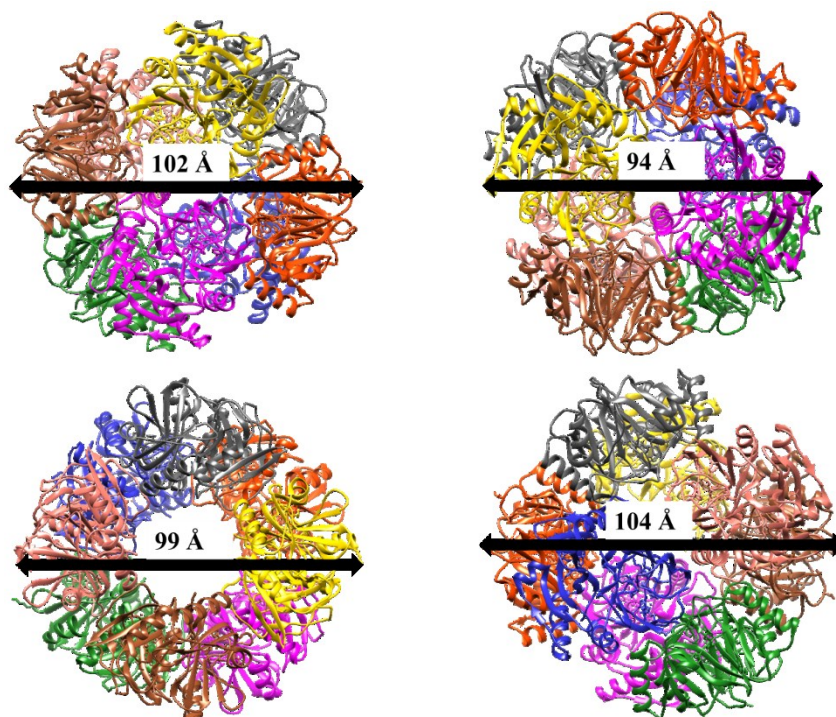


Figura 7: Complexo octamérico da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) em diferentes posições.

Visando caracterizar o estado oligomérico em solução da DoxG foi realizado o experimento de espalhamento dinâmico de luz (EDL), sendo que o diâmetro médio da partícula foi de 112,8 Å (Figura 8).

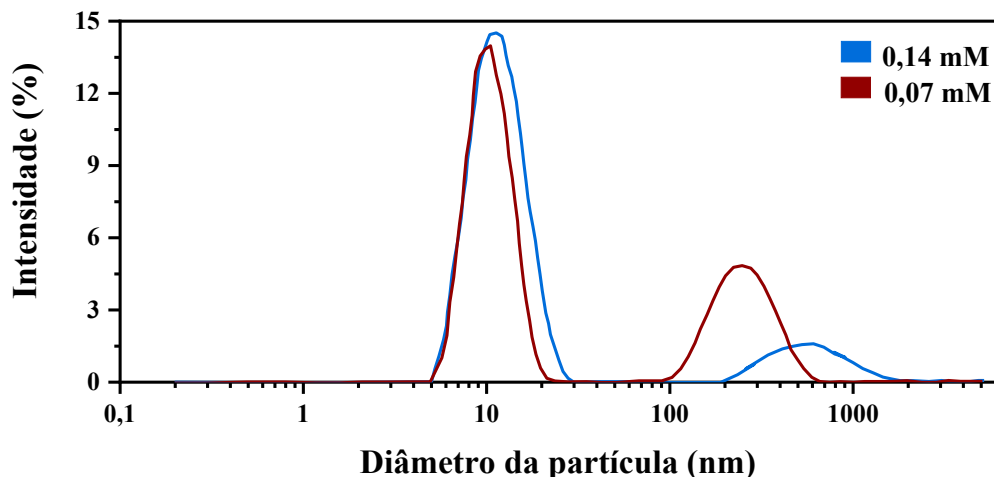


Figura 8: Espectro de espalhamento dinâmico de luz pela 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) obtido na temperatura de 10 °C. Enzima utilizada LBDoxGwt2.

Existem evidências de que esse arranjo octamérico influencia na atividade catalítica. O efeito da substituição da arginina por uma glicina na posição 101 resulta em um aumento de 12 vezes na atividade da enzima. Este resíduo encontra-se a mais de 30 Å do sítio ativo em uma unidade monomérica. No entanto, este resíduo encontra-se próximo à calda C-terminal da unidade monomérica vizinha no complexo octamérico, fato este capaz de explicar essa alteração na atividade, uma vez que essa porção encontra-se sobre a cavidade do sítio ativo (Fortin et al., 2005a; Neau, 2004).

Esse arranjo octamérico não é encontrado em todas as extradiol dioxigenases do tipo I. A lapB, uma catecol 2,3-dioxigenase da via de degradação de alquilfenol de cadeia longa em *Pseudomonas* sp. KL28, por exemplo, apresenta uma estrutura quaternária caracterizada por um arranjo homotetramérico (cho et al., 2009). A 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase de *Bacillus* sp. JF8 também é formada pela união de quatro subunidades (Hatta et al., 2003). Já a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) extradiol dioxigenase de *Streptomyces sclerotialis* (SsDDO) foi determinada como sendo um homodímero, sendo a primeira extradiol dioxigenase do tipo I com esse estado oligomérico a ser descoberta (Wang et al., 2019).

4.4 Reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno Dioxigenase

Durante a preparação de extradióis dioxigenases, a enzima pode perder o íon ferroso. Além disso, qualquer contato que ela tenha com o dióxigênio pode causar a oxidação do metal formando o íon férrico, fator que também leva a inativação da enzima (Cerdan et al., 1994; Eltis et al., 1993; Kojima, Itada, & Hayaishi, 1961; Nozaki et al., 1968; Vaillancourt et al., 2002).

A recuperação da atividade enzimática pode ser realizada com agentes redutores como ácido ascórbico, borohidreto de sódio, glutatona, cisteína e ditionito de sódio. Neste caso, a oxidação do agente redutor, concomitantemente, com a redução do íon férrico a sua forma bivalente restaura o estado de oxidação do cofator, tornando a enzima apta a mediar a transferência de elétrons entre o substrato e o dióxigênio durante o processo catalítico (Cerdan et al., 1994; Emerson et al., 2008; Fielding et al., 2011; Takemori, Komiyama & Katagiri, 1971; Uragami et al., 2001). Outra forma de recuperar a atividade perdida é incubar a enzima com sais que apresentam o cátion Fe^{+2} , como o sulfato ferroso ou o sulfato ferroso amoniacal. Neste cenário, quando o cátion bivalente for adicionado ao meio, uma vez que a enzima apresenta alta afinidade pelo mesmo, ele se ligará a apoenzima restaurando a sua forma ativa. (Nozaki et al., 1968).

A reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase foi descrita por Patel e Barnsley (1980), que incubaram a enzima com 0,5 mM de sulfato ferroso em tampão de fosfato (20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$, pH 6,2, contendo 1 mM de 2-mercapetanol e etanol 10% v/v), sendo que a solução foi desgaseificada e armazenada em um dessecador a vácuo por um período de 40 a 60 minutos antes do uso. Todavia, os autores não mencionam se foram testadas outras condições de reativação.

Outro estudo em que está descrito a reativação da 1,2-DHNDO foi conduzido por Kuhm e colaboradores (1991). Estes incubaram as amostras de enzima obtidas após a purificação com sulfato ferroso amoniacal (2 mM) e ácido ascórbico (5 mM) por 30 minutos para medidas rotineiras de atividade enzimática. Mas segundo eles, esta condição era capaz de restaurar apenas 30% da atividade enzimática, sendo que o máximo de atividade observado foi obtido ao incubar a enzima por 6 horas nessas mesmas condições.

Nos estudos conduzidos para a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) por Fortin e colaboradores (2005c), uma vez que a purificação da enzima foi conduzida em condições anaeróbicas com a utilização de uma “glovebox” e tampões desgaseificados, os autores não reativaram a enzima antes de realizar medidas de atividade. No caso da 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenase essa mesma estratégia foi utilizada por Vaillancourt e colaboradores (1998), que

destacaram que a purificação da enzima em condições anaeróbicas resultou em uma enzima duas vezes mais ativa do que a enzima purificada em condições aeróbicas conduzidas pelo mesmo grupo de pesquisa (Eltis et al., 1993). No caso da DoxG, mesmo quando obtida em condições anaeróbicas, foi encontrado 0,35 mol do íon ferroso para cada mol de enzima (Barrialt et al., 1998), o que indica a necessidade de se estudar a reconstituição da holoenzima.

Contudo, deve-se observar que a reativação e a inativação são processo multifatoriais (Takemori et al., 1968; Takemori, Komiyama e Katagiri, 1971), de modo que quando o tratamento para reativar uma enzima dependente de Fe^{+2} é realizado, este não necessariamente garante que a reconstituição da mesma ocorrerá completamente. Assim, neste trabalho, visando determinar os possíveis fatores que poderiam influenciar o processo de reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno realizou-se experimentos em diferentes condições. Neste sentido, espera-se estabelecer um protocolo de reativação da mesma para posteriores estudos cinéticos.

Ao reativar uma metapirocatecase – uma extradiol dioxigenase –, Takemori, Komiyama e Katagiri (1971) não observaram diferença na eficiência do processo de reativação entre incubar a enzima com solução contendo, somente, o íon Fe^{+2} e incubar a enzima com o cofator juntamente com agentes redutores como cisteína, glutatona ou ácido ascórbico. No entanto, em outros trabalhos essa diferença foi observada, sendo a combinação do cofator com o agente redutor responsável por gerar enzimas mais ativas (Nozaki et al., 1968; Uragami et al., 2001). Podemos mencionar o caso da 2,3-dihidroxibifenil dioxigenase que apresentou atividade específica de 17 U/mg ao ser incubada com ácido ascórbico e 80 U/mg quando incubada com sulfato ferroso. Já no caso da enzima sendo incubada com ambos compostos, observou-se uma atividade específica de 112 U/mg (Uragami et al., 2001).

Outro fato que deve ser mencionado é que alguns estudos realizam a reativação da enzima em tampão desgaseificado, evitando a presença de dioxigênio dissolvido no tampão, o que poderia de outra forma causar a oxidação do cofator (Patel, & Barnsley, 1980; Uragami et al., 2001). Contudo, segundo Takemori, Komiyama e Katagiri (1971), nos estudos realizados por eles a reação de ativação não foi afetada pela incubação sob condições aeróbicas ou anaeróbicas. Neste trabalho, uma vez que não realizamos nenhum estudo detalhado visando confirmar se a desgaseificação do tampão poderia interferir na atividade enzimática, optamos por incubar a enzima sempre com ácido ascórbico 1 mM de modo a garantir que os cátions do elemento ferro estivessem em sua forma bivalente e a oxidação por dioxigênio fosse evitada.

Outro agente protetor adicionado as condições de reativação deste trabalho foi o álcool *terc*-butílico, adicionado em uma proporção de 5% v/v. Embora o álcool *terc*-butílico seja um inibidor da enzima, ele apresenta a capacidade de evitar a oxidação do centro metálico (Vaillancourt et al., 1998). Além disso, a incubação da enzima foi realizada em banho de gelo de modo a manter a temperatura inferior a 4 °C, evitando, dessa forma, a possível desnaturação devido a mudanças conformacionais (Takemori, Komiyama, & Katagiri, 1971).

4.4.1 Efeito do pH na reativação

Outro fator capaz de influenciar o processo de reativação é o pH do tampão em que a enzima será incubada com o cofator. Esta influência foi avaliada por Takemori, Komiyama e Katagiri (1971) que identificaram que a velocidade de recombinação de uma metapirocatecase com o íon metálico é consideravelmente afetada pelo pH visto que, para a enzima estudada por eles, o processo de reativação ocorria de forma extremamente lenta com tampões próximos à neutralidade. Enquanto no pH de 6,0 a enzima já havia recuperado completamente sua atividade após ser incubada por 40 minutos, para este mesmo tempo de incubação no pH 6,6, nem 50% da atividade fora restaurada.

Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa (Takemori et al., 1968) conduzido para uma homogentisato oxidase – uma enzima que usa como cofator o íon ferroso em processos de oxidação – observou-se que a velocidade da reativação da apoenzima aumentava muito com o aumento da acidez do meio, tendo sido a atividade recuperada quase que completamente após 2 horas de incubação no pH 5,6. Já quando o potencial hidrogeniônico da solução de reativação era neutro a completa reativação da enzima era alcançada apenas após 24 horas.

No presente estudo, este mesmo comportamento de diminuição da velocidade de reativação em função do aumento do pH foi observado para a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase conforme pode ser observado na Figura 9. Após ser incubada por 10 minutos no tampão pH 5,75 a enzima apresentou uma atividade específica de 0,82 U/mg que é cerca de 5 vezes maior do que o valor observado para o mesmo tempo de incubação no pH 7,5 (atividade específica de 0,16 U/mg). A ativação também ocorre mais rapidamente, após 30 minutos em pH 5,75, a atividade atingiu o valor de 2,32 U/mg, que é um aumento de 2,8 vezes em relação a 10 minutos de incubação. Ao passo que após 30 minutos, para o pH 7,5, a atividade medida foi de somente 0,29 U/mg, o que representa um aumento de 1,8 vezes em relação à atividade observada para o tempo de 10 minutos.

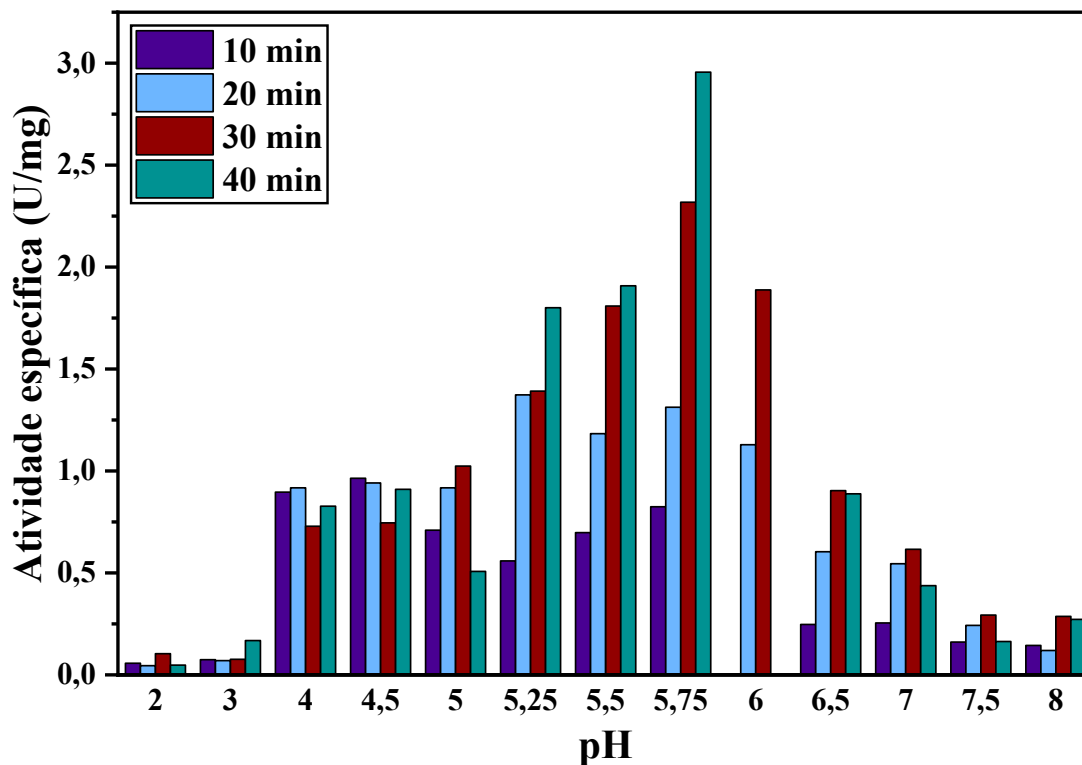


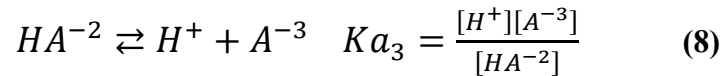
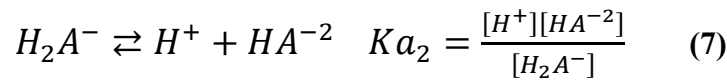
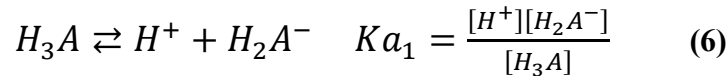
Figura 9: Atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxygenase após ser incubada por diferentes tempos em diferentes pHs. Dados: os tampões encontravam-se na concentração de 50 mM – para os pHs 2 e 3 foi usado o H_3PO_4 , 4 até 6 o ácido acético/acetato e de 6,5 até 8 o NaH_2PO_4 . Após ser incubada (0,854 g/L) com 0,3 mM de sulfato ferroso e 1 mM de ácido ascórbico, a atividade enzimática foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de 17,08 mg/L no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. Enzima utilizada M9MnDoxGwt3.

Dentre as hipóteses para o fato de que a medida em que o pH diminui, a velocidade do processo de reativação é aumentada, vem da possibilidade de que, com a redução do pH da solução, a capacidade da enzima de se quelar ao cofator é aumentada devido a mudanças conformacionais em regiões nas proximidades do sítio ativo. Outra evidência que sustenta essa hipótese é o fato de que uma metapirocatase ao ser incubada com íons ferrosos na presença de ureia – composto capaz de provocar mudanças conformacionais e até mesmo a desnaturação em elevadas concentrações – teve sua atividade específica aumentada consideravelmente em relação à enzima incubada apenas com o cofator (Takemori, Komiyama, & Katagiri, 1971). Além disso, uma vez que a concentração do íon ferroso livre em solução é aumentada a medida em que o pH da solução diminui, isso poderia contribuir para uma maior disponibilidade do mesmo fazendo com que, em

parte, o aumento da velocidade de reativação possa ser atribuído a este fator (Flamm, & Crandall, 1963).

Com o objetivo de explorar em mais detalhes a influência do pH no processo de reativação. O comportamento em formato sino observado na Figura 10 foi modelado como um sistema triprótico, sendo os equilíbrios tratados conforme descrito a seguir:

Para um sistema triprótico, os equilíbrios e as expressões que relacionam as espécies em cada reação são dados por:



que se relacionam com o balanço de massa:

$$C_{H_3A} = [H_3A] + [H_2A^-] + [HA^{-2}] + [A^{-3}] \quad (9)$$

onde C_{H_3A} é a concentração total das espécies representativas em solução.

Sabendo que:

$\chi_1 =$ fração molar de H_3A

$\chi_2 =$ fração molar de H_2A^-

$\chi_3 =$ fração molar de HA^{-2}

$\chi_4 =$ fração molar de A^{-3}

$$\chi_1 + \chi_2 + \chi_3 + \chi_4 = 1 \quad (10)$$

que são regidas pelas seguintes expressões:

$$\chi_1 = \frac{[H_3A]}{C_{H_3A}} = \frac{[H_3A]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [HA^{-2}] + [A^{-3}]} \quad (11)$$

$$\chi_2 = \frac{[H_2A^-]}{C_{H_3A}} = \frac{[H_2A^-]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [HA^{-2}] + [A^{-3}]} \quad (12)$$

$$\chi_3 = \frac{[HA^{-2}]}{C_{H_3A}} = \frac{[HA^{-2}]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [HA^{-2}] + [A^{-3}]} \quad (13)$$

$$\chi_4 = \frac{[A^{-3}]}{C_{H_3A}} = \frac{[A^{-3}]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [HA^{-2}] + [A^{-3}]} \quad (14)$$

Substituindo as expressões de equilíbrio no balanço de massa, temos que as frações molares dependem apenas da concentração hidrogeniônica e das constantes de equilíbrio:

$$\chi_1 = \left(\frac{Ka_1}{[H^+]} + \frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2} + \frac{Ka_1Ka_2Ka_3}{[H^+]^3} + 1 \right)^{-1} \quad (15)$$

$$\chi_2 = \left(\frac{[H^+]}{Ka_1} + \frac{Ka_2}{[H^+]} + \frac{Ka_2Ka_3}{[H^+]^2} + 1 \right)^{-1} \quad (16)$$

$$\chi_3 = \left(\frac{[H^+]^2}{Ka_1Ka_2} + \frac{[H^+]}{Ka_2} + \frac{Ka_3}{[H^+]} + 1 \right)^{-1} \quad (17)$$

$$\chi_4 = \left(\frac{[H^+]^3}{Ka_1Ka_2Ka_3} + \frac{[H^+]^2}{Ka_2Ka_3} + \frac{[H^+]}{Ka_3} + 1 \right)^{-1} \quad (18)$$

A função que descreve a atividade enzimática (A) para um sistema triprótico com quatro espécies é dada em termos do somatório do produto da fração molar de cada espécie envolvida no equilíbrio e suas atividades:

$$A = A_1\chi_1 + A_2\chi_2 + A_3\chi_3 + A_4\chi_4 \quad (19)$$

Logo:

$$A = A_1 \left(\frac{Ka_1}{[H^+]} + \frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2} + \frac{Ka_1Ka_2Ka_3}{[H^+]^3} + 1 \right)^{-1} + A_2 \left(\frac{[H^+]}{Ka_1} + \frac{Ka_2}{[H^+]} + \frac{Ka_2Ka_3}{[H^+]^2} + 1 \right)^{-1} + A_3 \left(\frac{[H^+]^2}{Ka_1Ka_2} + \frac{[H^+]}{Ka_2} + \frac{Ka_3}{[H^+]} + 1 \right)^{-1} + A_4 \left(\frac{[H^+]^3}{Ka_1Ka_2Ka_3} + \frac{[H^+]^2}{Ka_2Ka_3} + \frac{[H^+]}{Ka_3} + 1 \right)^{-1} \quad (20)$$

Esta equação foi utilizada para o ajuste não-linear mostrado na Figura 10, que apresenta a atividade enzimática após a incubação por um período de 30 minutos em função do pH. Os parâmetros descritos por esta equação foram obtidos do ajuste não-linear e podem ser observados no quadro 2:

Quadro 2 - Valores das atividades das espécies e das constantes de equilíbrio obtidas para a os dados da Figura 10.

<i>Atividade (U/mg)</i>		<i>Ka</i>	
A1	0,1	Ka1	$3,16 \times 10^{-4}$
A2	0,68	Ka2	$1,26 \times 10^{-6}$
A3	6,14	Ka3	$1,61 \times 10^{-6}$
A4	0,25		

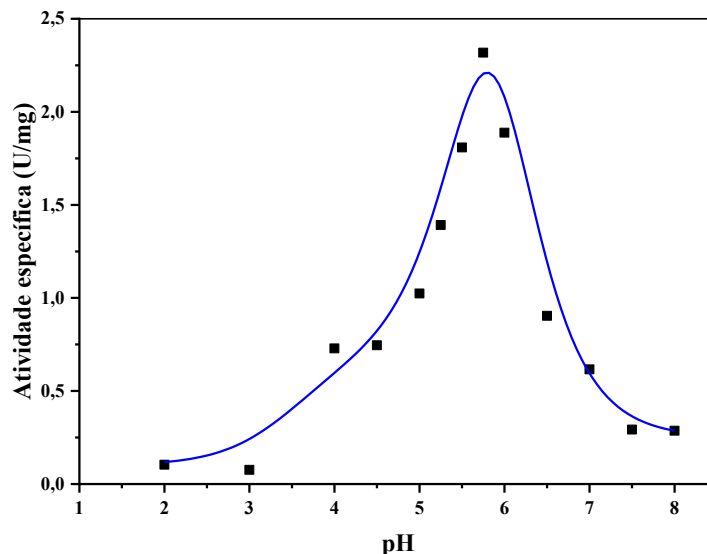


Figura 10: Atividade específica da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase após ser incubada por 30 minutos em diferentes pHs. Dados: os tampões encontravam-se na concentração de 50 mM – para os pHs 2 e 3 foi usado o H_3PO_4 , 4 até 6 o ácido acético/acetato e de 6,5 até 8 o NaH_2PO_4 . Após ser incubada (0,854 g/L) com 0,3 mM de sulfato ferroso e 1 mM de ácido ascórbico, a atividade enzimática foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de 17,08 mg/L no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. Enzima utilizada M9MnDoxGwt3.

A velocidade máxima para o processo de reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase foi obtida no pH 5,75 (Figura 10). Takemori, Komiyama e Katagiri (1971) observaram para a metapirocatecase que a reativação em pH abaixo de 5,6 atingia o máximo muito rapidamente. Contudo, eles apontam que a permanência da enzima em pH inferiores a este levava a inativação da enzima, muito provavelmente, por desnaturação.

No presente estudo, observamos que, para valores de pH inferiores a 5,75, a atividade da enzima aumentava à medida que a mesma permanecia por mais tempo na solução de reativação. Entretanto, essa velocidade de recuperação da atividade era inferior à velocidade máxima que fora obtida no pH 5,75. Não foi conduzido nenhum experimento que pudesse fornecer evidências de que o processo de reativação nos meios ácidos estaria competindo, de alguma forma, com o processo de desnaturação da enzima.

O comportamento em sino observado na Figura 10 – conforme os valores de pKa (Quadro 2) que são $\text{pK}_{a1} = 3,5$, $\text{pK}_{a2} = 5,9$ e $\text{pK}_{a3} = 5,8$ – pode ser atribuído ao fato de que o íon ferroso na DoxG encontra-se quelado por dois resíduos de histidina e um resíduo de glutamato. E uma vez

que o pKa da histidina é próximo de 6,0 é possível que o aumento da concentração da sua forma protonada influencie negativamente na ligação do íon ferroso e, conseqüentemente, na eficiência do processo. Já a queda considerável de atividade observada entre o pH 3-4 é possivelmente devido à desnaturação e/ou protonação dos resíduos de glutamato ou o segundo resíduo de histidina cujos valores de pKa das cadeias laterais são, respectivamente, próximos de 4,2 e 6,0 nos aminoácidos livres a depender do ambiente químico proteico.

Além disso, não se pode descartar a possibilidade do envolvimento de outros resíduos que interagem com o Fe^{+2} antes de o mesmo alcançar a tríade facial 2-His-1-carboxilato, caso estivessem com seus elétrons comprometidos em outras interações, não poderiam auxiliar tão facilmente o cofator em seu percurso. Ainda que estes fatores não tenham uma relação tão diretamente perceptível quanto as protonações dos resíduos que se ligam ao ferro, sua existência não pode ser descartada.

4.4.2 Efeito do tampão na reativação

Além de avaliar o efeito de diferentes pHs investigou-se a influência do tampão na eficiência da reativação. Para isso, comparou-se no pH 6,0 a atividade específica da DoxG incubada em tampão fosfato e acetato. Foi observado que no tampão acetato a reativação foi mais eficiente conforme pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 3 - Comparação da atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase incubada em tampão acetato e fosfato. Enzima utilizada M9MnDoxGwt3.

<i>pH</i>	<i>Tampão</i>	<i>Concentração do tampão (mM)</i>	<i>Tempo de incubação (min)</i>	<i>Atividade específica ($\mu\text{Mmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)</i>
6,0	Fosfato	50	20	0,563
6,0	Fosfato	50	30	0,969
6,0	Acetato	50	20	1,128
6,0	Acetato	50	30	1,888

A influência da natureza do tampão na eficiência do processo de reativação de uma homogentisato oxidase foi estudada por Flamm e Crandall (1963). Os estudos conduzidos pelos autores demonstraram que quando o tampão fosfato – em comparação a um tampão acetato para o

mesmo pH – era utilizado, uma menor quantidade de íons ferrosos encontrava-se disponíveis em solução para se complexar com a enzima. Conforme observado no Quadro 2, nosso dado corrobora com os resultados obtidos por estes autores, a atividade específica tendo acetato como tampão é cerca de 2 vezes maior do que observado para fosfato. Assim, o tampão de ácido acético/acetato foi escolhido para os estudos de reativação que se seguiram.

4.4.3 Efeito da concentração de íon ferroso

Outro fator que pode influenciar na extensão da reativação é a concentração de ferro presente na solução de reativação. Takemori e colaboradores (1968) demonstraram que o aumento da concentração do cátion bivalente contribuiu para o aumento da atividade enzimática até que sua concentração atingisse o valor de 5 mM, sendo que quantidades superiores a esta não resultavam no aumento da extensão da reativação em tampão acetato pH 5,7 com incubação por 4 horas. Embora não tenhamos avaliado como a concentração do cofator pode afetar a extensão da reativação da DoxG, buscamos compreender se este fator poderia afetar a velocidade de reativação. Para isso, a enzima foi incubada por 40 minutos com diferentes concentrações de sulfato ferroso (Figura 11).

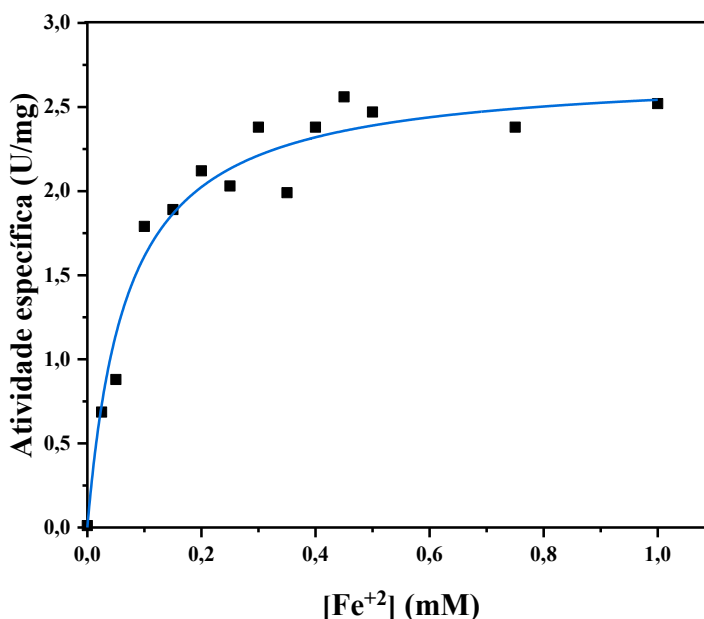


Figura 11: Efeito da concentração de íon ferroso na reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase. Dados: incubada (0,854 g/L) em tampão com ácido acético/acetato, pH 5,75, ácido ascórbico (1 mM) e

contendo diferentes concentrações de sulfato ferroso. Após ser incubada na solução de reativação por 40 minutos, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM) estando a mesma na concentração de 8,54 mg/L no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. A curva de ajuste foi plotada a partir da equação de Langmuir (Equação 21). Enzima utilizada M9MnDoxGwt3.

$$A = \frac{A_{max}[Fe^{+2}]}{K_d^{ap} + [Fe^{+2}]} \quad (21)$$

A partir da equação de ajuste prevemos uma atividade máxima de $2,717 \pm 0,002$ U/mg. O K_d^{ap} para a ligação do íon ferroso foi de $0,0685 \pm 0,0004$ mM.

O perfil na Figura 8 mostra que atividade específica cresce com a concentração de ferro na solução. Após a concentração atingir o valor de 0,45 mM não se observa um aumento aparente da atividade ao adicionar concentrações maiores de sulfato ferroso. Desta forma é possível inferir que a concentração de cofator é alta o suficiente em solução de modo a completa incorporação do mesmo na enzima. Os demais ensaios foram realizados com o sulfato ferroso na concentração de 0,5 mM. Utilizamos essa concentração seguindo o que foi descrito no trabalho de Patel e Barnsley (1980), visando evitar a ocorrência de reações Fenton que poderiam inativar a enzima.

4.4.4 Efeito do tempo de reativação

Conforme já apresentado, o pH influencia na eficiência da reativação e no tempo em que a enzima deverá permanecer na solução para incorporar o íon ferroso e atingir sua atividade máxima. No trabalho de Takemori e colaboradores (1971), no pH ótimo para a reativação, a metapirocatecase precisou ser incubada por 40 minutos para atingir a atividade máxima. Por outro lado, no estudo em que fizeram com a homogentisato oxidase esse tempo foi de 2 horas (Takemori et al., 1968). Deste modo visando compreender qual o tempo necessário para reativar a DoxG, foi realizado um estudo cinético cujos resultados podem ser observados na Figura 12.

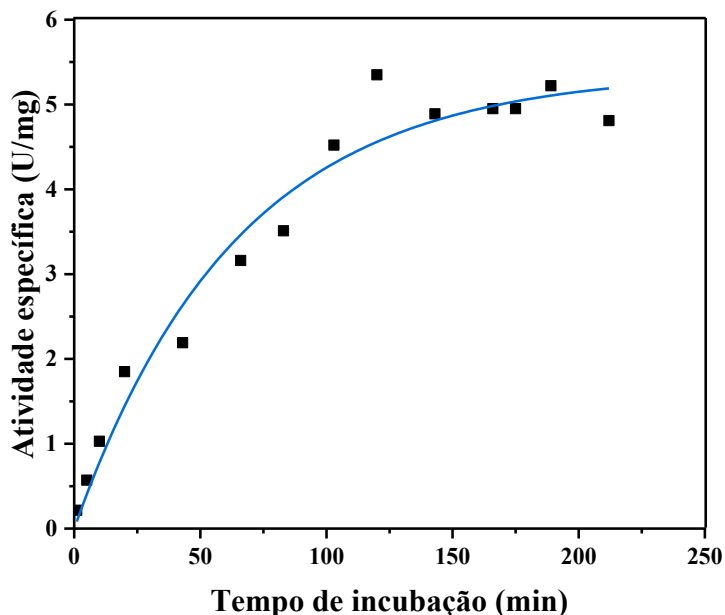


Figura 12: Efeito do tempo de incubação da enzima com íons Fe^{+2} no aumento da atividade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase. Dados: incubada (0,854 g/L) em tampão com ácido acético/acetato, pH 5,75, com FeSO_4 (0,5 mM) e ácido ascórbico (1 mM). Após ser incubada por diferentes intervalos de tempo, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de 8,54 mg/L no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética de 1ª ordem (Equação 22). Enzima utilizada M9MnDoxGwt3.

Quanto mais tempo a enzima é incubada mais ela tem sua atividade aumentada. No entanto, a partir de duas horas de incubação a atividade específica oscila por volta do valor de 5,03 U/mg sem muita variação. Sendo que a atividade máxima prevista considerando uma lei de velocidade de primeira-ordem (Equação 22) foi de $5,3 \pm 0,3$ U/mg. A constante de velocidade foi de $0,015 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$, sendo o tempo de meia-vida de 46 minutos. A partir deste modelo matemático é possível prever que o tempo necessário para a reativação de 99% da enzima, nessas condições, é de aproximadamente 300 minutos e que 90% da atividade era recuperada após 150 minutos de incubação, sendo este tempo utilizado em estudos posteriores. Convém ressaltar que, em alguns experimentos, a atividade começou a ser perdida após um tempo superior a seis horas de incubação.

$$A = (A_t - A_0)(1 - e^{-kt}) + A_0 \quad (22)$$

Onde A é a atividade, t o tempo, k a constante de velocidade, A_0 é a atividade inicial e A_t é a atividade no tempo t.

4.4.5 Efeito de sais sobre a reativação

Embora não tenhamos encontrado nenhum relato na literatura de como a concentração de sais poderia afetar o processo de reativação de extradióis dioxigenases ou outras enzimas dependentes de Fe^{+2} , optamos por explorar este fator visto que vários processos que ocorrem com as proteínas, tal como o enovelamento e dinâmica são influenciados pela força iônica da solução (Cacace, Landau, & Ramsde, 1997; Dill, 1990; de Los Rios, & Plaxco, 2005; Timasheff, 1992; Tzul, Schweiker, & Makhatadze, 2015). Podemos citar a relevância desse tópico com base no trabalho realizado por Marolt e Lüdeke (2019), em que os autores demonstraram que a constante de dissociação do NADH (K_d), referente a formação do complexo enzima-cofator em uma álcool desidrogenase, aumentava com o aumento da força iônica da solução.

Conforme pode ser observado na Figura 13, o aumento da concentração de sulfato de sódio em solução provocou uma redução na atividade enzimática. Sendo que a atividade caiu pela metade quando a força iônica foi aumentada de aproximadamente 0,05 para 0,15 M. Para a faixa em que trabalhamos, observou-se que a atividade da enzima caiu consideravelmente com a adição deste sal na solução até aproximadamente 0,3 M, quando passou a ter pouca influência no processo de reativação.

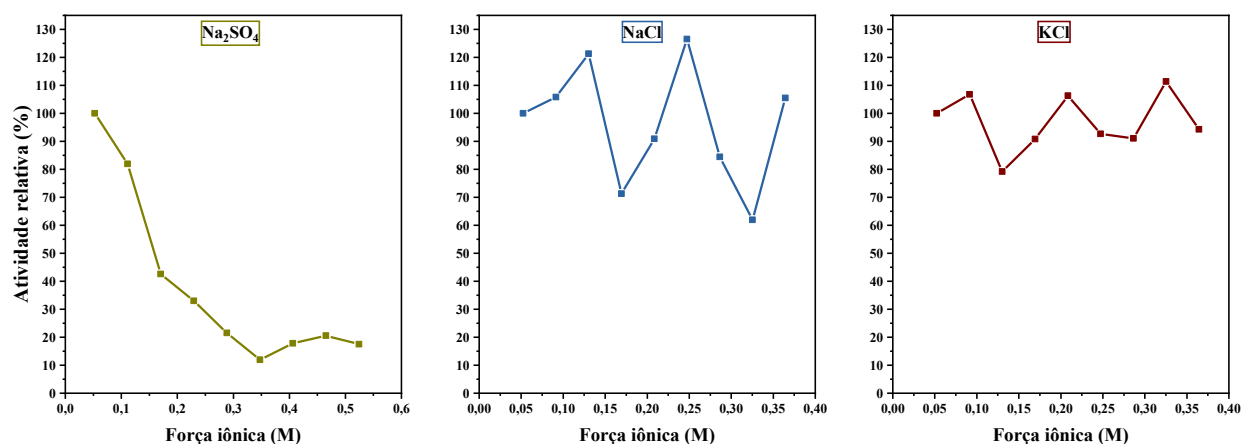


Figura 13: Efeito da presença de sais na extensão da reativação. Dados: incubada (1,33 g/L) em tampão com ácido acético/acetato, pH 5,75, com FeSO_4 (0,5 mM) e ácido ascórbico (1 mM). Após ser incubada com diferentes concentrações de sulfato de sódio, cloreto de sódio ou cloreto de potássio por um tempo superior a duas horas e meia, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de 26,6 mg/L no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. Enzima utilizada M9MnDoxGwt5.

Já para o cloreto de sódio e cloreto de potássio não foi observado um perfil bem definido de aumento ou redução da atividade enzimática. Embora a atividade relativa tenha oscilado consideravelmente, pode-se dizer que estes sais não afetaram a extensão da reativação. Deste modo, é possível inferir que o processo de reativação não é sensível a alterações da força iônica. Contudo, sulfato de sódio pode afetar o processo de reativação de forma específica.

Uma das possíveis explicações para o sulfato de sódio influenciar negativamente o processo de reativação é o fato do complexo formado entre os íons Fe^{+2} e o sulfato ser mais estável do que o complexo formado com o cloreto, cujas constantes de formação (β) são 246 e $0,5 \text{ M}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente (Smith et al., 2004). Esse fenômeno poderia influenciar a disponibilidade de íons ferrosos que poderiam estar complexados aos ânions. E, uma vez que, menos Fe^{+2} esteja disponível, a extensão da reativação poderá ser prejudicada.

Deste modo, entre as condições exploradas, foi possível observar que a atividade máxima foi obtida quando a enzima foi incubada por um tempo superior a duas horas e meia no tampão ácido acético/acetato (50 mM), pH 5,75, contendo 5% v/v de álcool *terc*-butílico, com 0,5 mM de sulfato ferroso e 1 mM de ácido ascórbico, sem adicionar qualquer outra substância que pudesse provocar um aumento da força iônica da solução. Essa condição foi utilizada como padrão para reativar a enzima e realizar os demais ensaios.

As atividades específicas das enzimas purificadas foram determinadas nessas condições conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade específica dos lotes da enzima DoxG. Dados: As enzimas foram incubadas em tampão com ácido acético/acetato, pH 5,75, com FeSO_4 (0,5 mM) e ácido ascórbico (1 mM). Após ser incubada por mais de duas horas e meia, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de no meio reacional – tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5. As análises foram feitas em quintuplicatas.

<i>Lote</i>	<i>Atividade específica (U/mg)</i>
LBDoxGwt1	ND
LBDoxGwt2	$4,1 \pm 0,5$
M9FeDoxGwt1	$0,07 \pm 0,01$
M9FeDoxGwt2	$4,3 \pm 0,1$
M9MnDoxGwt1	$0,29 \pm 0,06$
M9MnDoxGwt2	$3,3 \pm 0,3$

M9MnDoxGwt3	4,9 ± 0,2
M9MnDoxGwt4	1,7 ± 0,4
M9MnDoxGwt5	2,6 ± 0,3
M9MnDoxGwt6	0,9 ± 0,1

*ND = atividade não determinada.

4.5 Efeito do Íon Manganês na Atividade Enzimática

Os estudos de reativação mencionados anteriormente foram conduzidos com a enzima obtida em meio suplementado com 90 mg/L de MnCl₂ e tampão de troca iônica contendo esse mesmo sal. As enzimas obtidas nessa condição apresentam atividade desprezível antes de serem reativadas, o que revela que a Mn-DoxG não é ativa e a atividade basal é proveniente da Fe-DoxG que se encontra em baixa concentração. Essa hipótese foi confirmada realizando-se o procedimento descrito por Fielding e colaboradores (2011) em que a enzima foi incubada com 1 mM de H₂O₂ por cinco minutos e na sequência medindo-se a atividade, sendo que neste caso nenhuma atividade catalítica foi observada.

Neste sentido, os estudos de cinética descritos aqui revelam, não apenas a ligação do cofator Fe⁺², mas a troca do Mn⁺² por este elemento. Embora deve-se ressaltar que outros estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese. Isso pode incluir técnicas de biofísica como espectroscopia Mössbauer e/ou ressonância paramagnética eletrônica (EPR), apesar da ligação de outros cátions bivalentes ao sítio ativo de extradiol dioxigenases já ser algo demonstrado como possível em trabalhos descritos na literatura (Emerson et al., 2008; Fielding et al., 2011; Fielding, Lipscomb, & Que, 2012).

No estudo realizado por Patel e Barnsley (1980) os autores discutem que os íons Fe³⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Mg²⁺ não poderiam substituir o Fe⁺² no sítio ativo de modo que a enzima obtida, via essa troca de cofator, fosse ativa. Além de não resultar em uma enzima ativa, os íons Hg²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ e Fe³⁺ mostraram-se inibidores da 1,2-DHND. Em nossos estudos constatamos que o Mn⁺² não pode desempenhar a função de cofator na DoxG.

Na natureza, embora a maior parte das extradiol dioxigenases encontradas sejam dependentes de Fe⁺², algumas enzimas que utilizam o cátion bivalente do manganês são encontradas, tal como a 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase de *Bacillus* sp. JF8 (Hatta et al, 2003), 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenases de *Bacillus brevis* (Que Jr, Widom, & Crawford, 1981)

e a 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenase de *Arthrobacter globiformis* CM-2 (Boldt et al., 1995).

Além disso, estudos recentes com homoprotocatecuato 2,3-dioxigenases de *Brevibacterium fuscum* e *Arthrobacter globiformis* mostram que a despeito de estruturas similares, as enzimas desses organismos utilizam metais divalentes diferentes, Fe^{2+} e Mn^{2+} , respectivamente (Vetting et al., 2004). Isso ocorre sem efeito significativo na atividade catalítica, até mesmo com o intercâmbio desses metais, sendo igualmente ativas apesar da diferença de 0,7 V no potencial de redução do metal; $E^{\circ} = 0,77$ V para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e 1,5 V para $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$. Esse resultado implica que os metais promovem a ativação do dioxigênio sem uma mudança integral do estado redox durante a catálise (Emerson et al., 2008). Inclusive, o intercâmbio do Fe^{2+} da homoprotocatecuato 2,3-dioxigenase de *Brevibacterium fuscum* por Co^{2+} , que apresenta um potencial redox ainda mais elevado (1,92 V) do que o observado para Mn^{2+} , resultou em uma forma hiperativa da enzima (Fielding et al., 2011).

Embora o intercâmbio de metais seja algo possível, este não é observado para todas as extradiol dioxigenases. Pornsuwan e colaboradores (2017) incubaram a 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenase de *Pseudomonas aeruginosa* – uma dioxigenase dependente de ferro – com um agente capaz de remover o cofator. Na sequência a reativação da apoenzima com soluções contendo íons Fe^{+2} , Mn^{+2} e Co^{+2} , mostrou que apenas a enzima tratada com íons ferrosos apresentou atividade.

O potencial redox do cofator parece não ter grande relevância na catálise pelas extradiol dioxigenases, conforme descrito nos estudos referidos anteriormente, diferentemente de outras enzimas em que esta propriedade é relevante, tal como nas superóxido dismutases (Cotruvo, & Stubbe, 2012). Todavia, a razão pela qual em algumas extradiol dioxigenases é possível fazer essa troca de cofator e em outras não ainda permanece desconhecida.

No caso da enzima obtida em meio mínimo suplementado com excesso de Fe^{+2} que apresentou maior atividade específica, igual a $4,3 \pm 0,1$ U/mg após a reativação, houve um ganho de somente 2 vezes em relação à enzima não-reativada (atividade específica de $2,0 \pm 0,1$ U/mg). Fato este que revela que mais de 50% da atividade foi perdida durante a lise celular, purificação e armazenamento. A reativação apenas com 1 mM de ácido ascórbico aumentou a atividade para $2,2 \pm 0,3$ U/mg. É notável que este agente redutor exerceu pouca influência na restauração da atividade enzimática, o que revela que a maior parte da enzima fora inativada pela perda do cofator, sendo

um problema comumente enfrentado na obtenção de metaloenzimas (Hoffman et al., 1995). Um exemplo de dioxigenase em que houve a perda de cerca de 50% do cofator durante a obtenção da enzima foi relatado por Barney e colaboradores (2004) para a quercetina 2,3-dioxigenase de *Bacillus subtilis*.

4.6 Efeito da Força Iônica e da Adição de Tolueno na Catálise Enzimática

A variação da força iônica pode influenciar em interações próximas ao sítio ativo dificultando ou facilitando a formação dos complexos enzima-substrato e enzima-estado de transição. Isso não é uma surpresa, visto que esta é capaz de influenciar na conformação das macromoléculas através de interações eletrostáticas (Song, Cho, & Daniel, 2007). Isso faz com esse parâmetro seja relevante nos estudos envolvendo catálise enzimática.

Conforme discutido anteriormente, embora a força iônica não afete a extensão da reativação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase, o sulfato de sódio mostrou-se como um agente capaz de dificultar este processo. Visando estudar se esta influência também poderia ocorrer durante a catálise, o meio reacional foi preparado de modo a conter diferentes concentrações desse sal. Esse experimento foi conduzido de modo que a atividade da enzima foi avaliada para três concentrações distintas do substrato 3-metilcatecol (Figura 14).

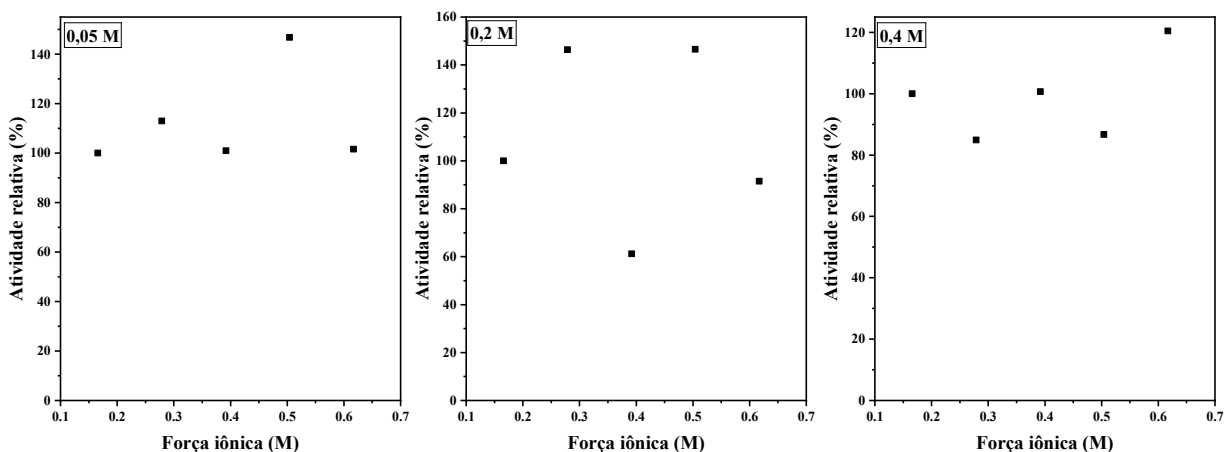


Figura 14: Influência da força iônica na catálise enzimática para três concentrações distintas de 3-metilcatecol (0,05 M, 0,2 M e 0,4 M). Dados: incubada (0,728 g/L) em tampão com ácido acético/acetato, pH 5,75, com FeSO₄ (0,5 mM) e ácido ascórbico (1 mM). Após ser incubada com diferentes concentrações de sulfato de sódio, por um tempo superior a duas horas e meia, a atividade da enzima foi medida, estando a mesma na concentração de 14,56 mg/L no meio reacional – tampão NaH₂PO₄ (100 mM) pH 6,5. Enzima utilizada M9MnDoxGwt4.

Diante de tais resultados é possível concluir que a força iônica da solução não afeta a cinética da reação. Todavia, uma vez que foi explorado apenas o sulfato de sódio, e considerando a complexidade dos fenômenos envolvendo os efeitos das interações iônicas e as macromoléculas, é importante ressaltar outros sais podem ter um efeito distinto. Isso porque, os sais podem interagir de diferentes formas com as estruturas moleculares seja de forma específica ou inespecífica a depender, por exemplo, dos efeitos ao longo de série de Hofmeister (Baldwin, 1996; Beauchamp, & Khajehpour, 2012; Salis et al., 2007).

Com um sítio ativo mais volumoso, a DoxG caracteriza-se por possuir uma preferência por substratos maiores. A Figura 15 apresenta as estruturas de substratos utilizados em estudos anteriores. Nos estudos realizados por Patel e Barnsley (1980), com a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas putida* NCIB 9816, foi observado que a atividade da enzima é vinte vezes maior para clivagem do substrato 1,2-DHN em relação ao 3-metilcatecol. Kuhm e colaboradores (1991) também mostraram que a enzima é mais ativa para a conversão do 1,2-DHN do que para o catecol e o 3-metilcatecol.

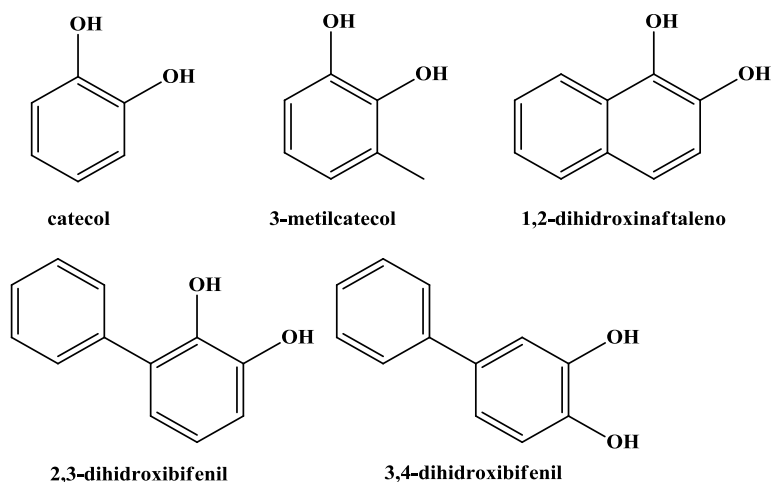


Figura 15: Estrutura de alguns substratos da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG).

Nas células, as enzimas podem ser reguladas por inibição e/ou ativação. Sendo que estratégias que visam aprimorar a catálise, através da ativação enzimática, representam grande potencial de pesquisa no campo da enzimologia. Enquanto uma gama de compostos artificiais que inibem as enzimas é conhecida, muito pouco ainda se sabe sobre moléculas capazes de desempenhar a função de ativadores enzimáticos (Zorn, & Wells, 2010). Entre os sistemas em que o mecanismo de ativação enzimática foi observado, podemos mencionar, como exemplo, a

ativação da Abelson tirosina quinase (c-Abl) por pirazolinas, em que se observou que tais moléculas são capazes de se ligar a um sítio alostérico provocando uma mudança conformacional em uma α -hélice levando a enzima a uma conformação ativa (Hong et al, 2014; Simpson et al., 2019; Yang et al., 2014). Outra estratégia bastante interessante, foi desenvolvida por Darby e colaboradores (2017), que desenvolveram ligantes capazes de se ligar covalentemente a um resíduo específico de uma glicosídeo hidrolase de modo a tornar a enzima mais ativa.

Outro trabalho interessante foi desenvolvido por Perez-Miller e colaboradores (2010), em que o composto *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida (Alda-1) foi utilizado como ativador de uma aldeído desidrogenase. Os estudos evidenciaram que essa molécula foi capaz de atuar como uma chaperona restaurando a conformação ativa da enzima. Ao se ligar no túnel de ligação ao substrato, ela dificultaria movimentos improdutivos do substrato no sítio catalítico, sendo ainda capaz de evitar uma inativação da enzima oriunda da formação de um aduto covalente entre o substrato e um dos resíduos de aminoácidos da macromolécula.

Baseando na estratégia descrita no trabalho mencionado anteriormente, com o objetivo de estudar se o tolueno poderia atuar como um co-substrato auxiliando na ligação do 3-metilcatecol, tornando a catálise mais eficiente, avaliou-se a atividade enzimática na presença de concentrações de tolueno (Figura 16). Nossa hipótese é a de que o tolueno poderia desempenhar o mesmo papel do anel distal do 1,2-dihidroxi-naftaleno, auxiliando na ligação do 3-metilcatecol e favorecendo a formação do complexo enzima-substrato.

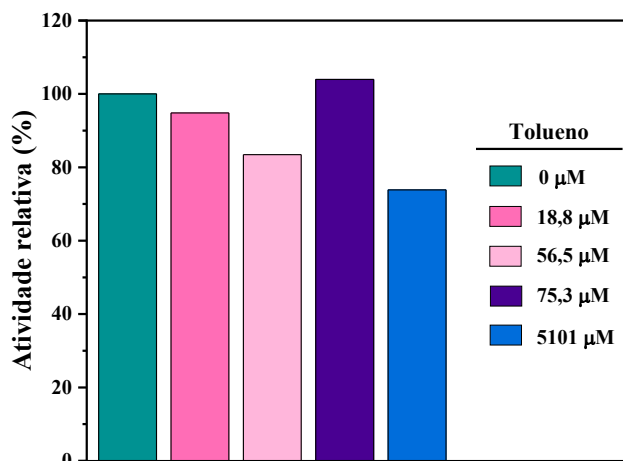


Figura 16: Atividade relativa da DoxG na presença de diferentes concentrações de tolueno. Dados: Enzima utilizada M9MnDoxGwt2, sendo a concentração na solução de reativação igual a 0,472 g/L e na cinética de 4,72 mg/L.

Como observado na Figura 13, pouca mudança foi observada na atividade na presença do tolueno, indicando que o mesmo não foi capaz de favorecer o processo catalítico. Além disso, a presença deste composto também não alterou a quantidade de produto formado, o que revela que ele não foi capaz de prevenir a inativação suicida da enzima devido à dissociação do intermediário catecol radicalar (Esquema 3) (Vaillancourt et al., 2002b). É possível que o tolueno não seja capaz de acessar o sítio ativo da enzima, embora este seja um bolsão com interações majoritariamente hidrofóbicas.

Sabe-se que a dinâmica da macromolécula e do substrato dentro do sítio-ativo afetam o processo de inibição suicida (Cho et al., 2010). Sendo que estratégias para tornar as enzimas mais ativas ou, principalmente, que busquem mitigar o efeito da inibição suicida representam um campo de pesquisa desafiador e importante no contexto das extradiol dioxigenases.

4.7 Inativação Térmica da DoxG

A termoestabilidade da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase foi avaliada incubando-se a enzima em diferentes temperaturas e intervalos de tempo conforme mostrado na Figura 17.

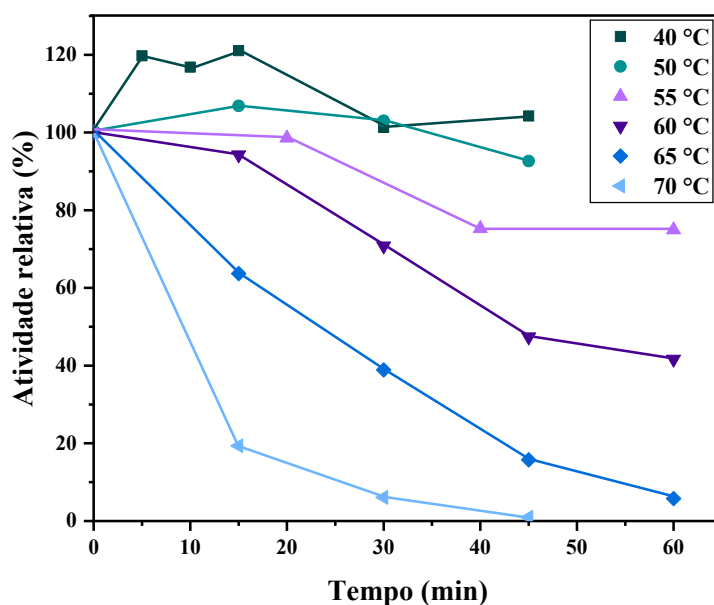


Figura 17: Perfil de inativação térmica da DoxG. Dados: Amostras da enzima foram incubadas por 150 minutos em temperatura inferior a 4°C na solução de reativação, e, em seguida, submetidas às temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por diferentes intervalos de tempo. Na sequência, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM), estando a mesma na concentração de 15,94 mg/L no meio reacional – tampão NaH₂PO₄ (100 mM) pH 6,5, a 25 °C. Enzima utilizada M9FeDoxGwt2.

A 70 °C foi observado uma rápida inativação da enzima, sendo que após 40 minutos de incubação a enzima encontrava-se quase que completamente inativa. Já na temperatura de 65 °C a enzima apresentou o tempo de meia-vida para a inativação de aproximadamente 20 minutos.

Esses resultados mostram que a DoxG é menos termoestável do que a 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase de *Bacillus* sp. JF8 – uma extradiol dioxigenase que apresenta grande termoestabilidade – em que foi observado que 100% e 75% da atividade enzimática foram mantidas quando a enzima foi incubada por 60 minutos nas temperaturas de 60 e 70 °C, respectivamente (Hatta et al., 2003). A enzima mostra-se, ainda, com estabilidade térmica inferior a outras extradiol dioxigenases como a 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase (BphC-SD3) e a catecol 2,3-dioxigenase (C23O-RW1) (Sidhu et al., 2019). No entanto, a enzima apresenta maior resistência a inativação térmica se comparada com as catecol 2,3-dioxigenases (C23O1 e C23O2) de bactérias halofílicas (Guo et al., 2015).

A termoestabilidade da 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenase é inferior à de enzimas encontradas em organismos termófilos, ou aquelas em que engenharia foi empregada visando aprimorar esta propriedade (Vieille, & Zeikus, 2001).

No trabalho de Dong e colaboradores (1992), ao comparar a termoestabilidade da catecol 2,3-dioxigenase de diferentes organismos, foi observado que a extradiol dioxigenase de um organismo termófilo (*Bacillus stearothermophilus*) perdeu cerca de 40% de sua atividade após ser incubada à 70 °C por 15 minutos, ao passo que a catecol 2,3-dioxigenase de *Pseudomonas putida* – um organismo mesófilo – foi praticamente inativada após ser incubada a 55 °C por esse mesmo período de tempo. Deste modo, visto que a DoxG não perdeu atividade após ser incubada a 55 °C por 15 minutos, mostrou-se mais termoestável do que a semelhante relatada do organismo mesófilo apesar de ser menos termostável do que a do organismo termófilo, já que perdeu 80% da atividade ao ser incubada a 70 °C por 15 minutos. Entretanto, cabe ressaltar que dada as distinções existentes na metodologia do nosso trabalho e daquele realizado por Dong e colaboradores, que utilizam extratos brutos celulares, tornam uma comparação precisa inviável.

Contudo, é interessante que em temperatura de até 50 °C não houve perda significativa da atividade quando a enzima foi incubada por tempos inferiores a 40 minutos. Além disso, em banho de gelo, na solução de reativação, a enzima manteve-se completamente ativa por até 4 horas após o período de incubação – dado não mostrado.

A termoestabilidade de uma enzima depende de uma série de fatores relacionados a estrutura proteica e, por consequência, está associada as interações intra e intermoleculares responsáveis pela estrutura da mesma, sendo que agentes externos como substratos, cofatores e sais são capazes de influenciar nesta propriedade (Vieille, & Zeikus, 2001).

Em algumas enzimas o cofator é necessário para a atividade enzimática apesar de sua presença não influenciar na estabilidade da proteína. Este é o caso, por exemplo, da glutaminil ciclase murina em que estudos de fluorescência evidenciaram que a presença ou ausência do Zn^{+2} não afetava a estabilidade proteica apesar deste íon ser um cofator necessário a catálise enzimática (Schilling et al., 2005).

Por outro lado, um trabalho desenvolvido por Kimura e colaboradores (2009) revelou a importância de íons Ca^{+2} na estabilidade do *Thermochromatium tepidum* LH1-RC, um complexo proteico presente na membrana de uma bactéria púrpura sulfurosa termofílica fotossintética encontrada em um complexo de fontes termais no Parque Nacional de Yellowstone. Esta se mostrou mais termoestável do que de suas congêneres mesófilas, sendo que a remoção do cálcio levava a perda de estabilidade do complexo, tornando a termoestabilidade semelhante àquelas observadas nas LH1-RCs purificadas a partir de bactérias mesófilas. A estabilidade térmica aprimorada era restaurada pela adição de Ca^{+2} a LH1-RC empobrecida neste cátion bivalente, e a substituição deste por outros íons metálicos resultava em uma diminuição na estabilidade térmica cuja extensão dependia das propriedades do elemento.

Outro exemplo em que a capacidade de sais em conferir estabilidade térmica a uma enzima foi observada é o estudo envolvendo a xilose isomerase de *Thermotoga neapolitana* (TNXI), em que o tempo de meia-vida observado na temperatura de 99 °C para a enzima incubada com 2 mM do cátion bivalente Mn^{+2} foi de 83 minutos, enquanto na presença de Co^{+2} , na mesma concentração, o tempo de meia-vida à 96 °C foi de 60 minutos. Já a apoenzima mostrou-se muito mais sensível à inativação térmica, apresentando tempo de meia-vida de apenas 11 minutos a 90 °C (Epting et al., 2005).

Existe uma vasta bibliografia no que se refere a busca da compreensão de como o cátion bivalente medeia a oxidação de catecois nas extradiol dioxigenases. Além disso, grande empenho na área tem sido dado a identificação de enzimas que não sejam dependentes de Fe^{+2} . Todavia, não encontramos nenhum relato sobre estudos que buscam compreender se o cofator desempenha algum papel na estabilização da estrutura tridimensional da macromolécula.

Visando compreender se o íon manganês (II) é capaz de tornar a DoxG mais termoestável, a M9FeDoxGwt2 foi incubada na ausência e presença de 1 mM de MnCl_2 a 60 °C por diferentes intervalos de tempo. Além disso, essa estabilidade foi comparada a M9MnDoxGwt5 (Figura 18) – enzima obtida em meio suplementado com excesso de manganês e tampão de troca-iônica contendo cátions desse elemento.

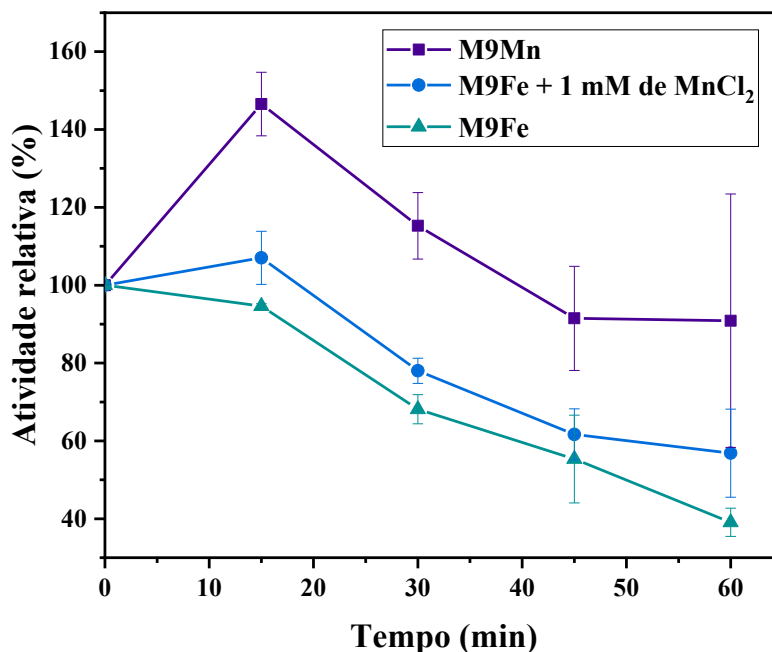


Figura 18: Perfil de inativação térmica da DoxG obtida em meio suplementado com excesso de ferro incubada ou não com cloreto de manganês (cada experimento foi realizado em duplicata) e da enzima obtida com meio de expressão e tampão de troca-iônica contendo manganês (quatuplicata). Amostras da enzima foram incubadas por 150 minutos em temperatura inferior a 4°C na solução de reativação, e, em seguida, submetidas às temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por diferentes intervalos de tempo. Na sequência, a atividade da enzima foi medida para a conversão do 3-metilcatecol (0,2 mM) em tampão NaH_2PO_4 (100 mM) pH 6,5, a 25 °C. No caso da enzima incubada com MnCl_2 , este foi adicionado no preparo da solução de reativação. Enzimas utilizadas foram M9MnDoxGwt5 e M9FeDoxGwt2, sendo as concentrações no meio reacional igual a 13,33 mg/L e 15,94 mg/L, respectivamente.

A adição de cloreto de manganês 1 mM à solução de reativação não afetou a extensão da reativação – dado não mostrado. Visto que a presença do manganês não inibiu a formação do complexo enzima-Fe, esse dado corrobora com o fato de o ferro ser o metal eleito por essa enzima como cofator. Entretanto, isso nem sempre é observado. Estudos conduzidos com a 2'-carboxi-2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenase, extradiol dioxigenase presente na via de degradação do

fluoreno em *Rhodococcus* sp. DFA3 mostraram que quando a enzima era incubada com 2 mM de soluções de diferentes sais, com exceção do FeCl_2 , os demais provocaram uma redução na atividade enzimática. No caso da enzima incubada com MnCl_2 , a atividade da enzima foi de 5% em relação à enzima não tratada, o que mostra que neste caso o Mn^{+2} provavelmente deslocou o Fe^{+2} (Kotake et al., 2016). É importante ressaltar que no presente trabalho não foi realizado nenhum estudo detalhado buscando evidenciar se a presença de íons dos metais Co, Mn, Zn, Ni, Ca, etc. poderiam afetar o processo de reativação.

Conforme observado na Figura 18, houve um grande aumento na atividade enzimática após a incubação à 60 °C por 15 minutos para a enzima contendo íon manganês (II). Essa observação indica que, possivelmente, a troca do metal do sítio-ativo pode ser afetada pela temperatura do sistema.

Percebe-se que, em menor extensão, este fenômeno foi observado para a enzima contendo ferro (Figura 17). Outros estudos precisam ser conduzidos para avaliar esse fenômeno, todavia, a luz dos dados disponíveis, é possível inferir que o aumento da temperatura favorece o equilíbrio no sentido da formação do complexo entre o ferro e a enzima. Assim, na faixa estudada, o aumento da temperatura parece favorecer a reativação ao mesmo tempo que contribui para a desnaturação enzimática.

A adição de íon manganês (II) a solução de reativação conferiu uma maior termoestabilidade a macromolécula. Contudo, esse efeito foi menos pronunciado do que o observado para a enzima expressa na presença de íon manganês (II). Tal observação corrobora com o trabalho de Miyazawa e colaboradores (2004) em que foi observado que a adição de 1 mM de MnCl_2 para a solução de enzima a 70 °C evitou a inativação da NahC_JF8 – extradiol dioxigenase que degrada o 1,2-dihidroxinaftaleno no organismo termofílico *Bacillus* sp. JF8. Esses dados sugerem que este íon pode desempenhar o papel de manutenção da estrutura tridimensional da macromolécula.

4.8 Relação Entre Íons Presentes em Solução e a Atividade da DoxG

Para as análises dos elementos presentes nas amostras das proteínas purificadas, utilizou-se a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). Essa técnica foi escolhida visto que as concentrações de vários elementos podem ser determinadas simultaneamente. Além disso, a análise permite quantificações na ordem de ppb e requer um pequeno volume de amostra

(Klockenkämper, & von Bohlen, 2001). Além disso, esta técnica permite a determinação de metais de transição como Fe, Ni, Cu, Zn, Mn, Mo, que podem ser determinados com alta precisão (Mertens, Rittmeyer, & Kolbesen, 2001; Wittershagen et al., 1997). Um exemplo da utilização desta técnica no contexto da enzimologia foi o trabalho desenvolvido por Schilling e colaboradores (2005), que quantificaram os elementos presentes em uma amostra de glutaminil ciclase murina (mQC), vindo a descobrir haver uma relação estequiométrica entre o conteúdo de zinco e de enzima na amostra, o que permitiu identificar, com o auxílio de outras técnicas, que este elemento atua como um cofator necessário a formação da holoenzima.

A padronização interna é o método mais adequado na determinação simultânea de mais de um elemento por TXRF, sendo que como padrão interno foi utilizado o elemento raro gálio (Klockenkämper, & von Bohlen, 2015). Este foi adicionado e homogeneizado de modo a estar presente na concentração de 2,5 mg/L. As análises foram feitas em duplicata. O valor médio da concentração foi subtraído do branco e multiplicado por 5 – fator de diluição da amostra.

A solução utilizada como branco foi o tampão C passado através da coluna de gel filtração HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade. Deste modo esta solução teria os mesmos constituintes das amostras que desejava-se analisar – compostos utilizados no preparo do tampão – sem conter, no entanto, a proteína de interesse. Conforme observado na Figura 19, traços dos elementos ferro, cobalto e zinco encontram-se presente na solução. Já o elemento manganês não foi detectado pela análise.

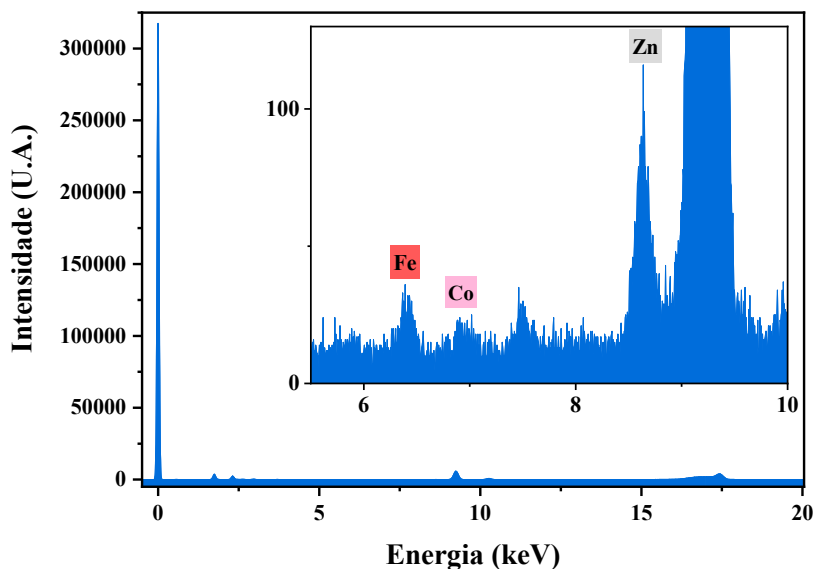


Figura 19: Um dos espectros de TXRF do tampão C eluído através da coluna de gel filtração.

As concentrações em mg/L de ferro, manganês, cobalto e zinco presente em cada uma das amostras de proteína encontram-se no Anexo II. No Quadro 3 é possível observar a porcentagem de cada um destes elementos em relação a quantidade de proteína presente nas amostras. Não foi possível calcular a concentração de cobalto em algumas amostras, embora o elemento estivesse presente, sua concentração era inferior ao limite de quantificação.

Quadro 4 - Porcentagem de Fe, Mn, Co e Zn incorporados pela DoxG obtida em diferentes condições.

<i>Lote</i>	<i>% cátion presente na proteína</i>			
	Fe	Mn	Co	Zn
LBDoxGwt1	11,35	4,29	ND	4,54
LBDoxGwt2	24,36	90,98	ND	16,42
M9FeDoxGwt1	6,95	2,11	ND	2,19
M9FeDoxGwt2	59,05	8,63	ND	15,47
M9MnDoxGwt1	3,8	4,43	ND	1,68
M9MnDoxGwt2	16	94,4	12,98	36,06
M9MnDoxGwt3	20,26	191,34	3,82	19,29
M9MnDoxGwt4	4,81	35,95	1,65	6,26
M9MnDoxGwt5	6,01	105,08	3,9	25,97
M9MnDoxGwt6	7,79	18,52	1,55	11,91

*ND = não determinado.

Ao comparar a porcentagem de manganês presente na amostra M9MnDoxGwt1 com as demais enzimas obtidas em meio suplementado com excesso de MnCl₂, notamos que ela foi a que incorporou a menor quantidade deste elemento. Duas possíveis explicações para a maior quantidade de manganês incorporado pelas demais enzimas expressas na presença deste elemento podem ser propostas: o aumento da concentração de cloreto de manganês no meio de cultura fez com que mais enzima se ligasse a esse elemento durante a expressão e/ou a presença do mesmo durante parte da purificação fez com que uma maior quantidade fosse observada na amostra ao final do processo.

É importante notar que mesmo para enzimas obtidas em uma mesma condição, a concentração dos elementos analisados divergia de uma amostra para outra, sendo que isso ocorre possivelmente devido à dissociação do complexo enzima-cofator, algo bastante comum em metaloenzimas, conforme discutido anteriormente.

Quando comparamos as enzimas obtidas no meio LB (Figura 20), no caso em que o tampão utilizado na cromatografia de troca iônica foi preparado de modo a conter íons manganês (II), observou-se uma maior quantidade deste elemento na amostra de proteína (Figura 20b) se comparada a enzima expressa nas mesmas condições, mas na ausência de cloreto de manganês durante a purificação (Figura 20a). Deste modo, é possível inferir que parte do manganês presente nas amostras obtidas provém do tampão de troca-iônica, o que reforça que o metal pode se desprender do sítio ativo ou se complexar a ele durante o processo de purificação como amplamente discutido na literatura (Cerdan et al., 1994; Eltis et al., 1993; Vaillancourt et al., 2001).

Dado que algumas amostras apresentaram valores superiores a 100% para este elemento, duas hipóteses apresentam-se plausíveis: (i) o manganês pode se ligar em mais de um sítio na macromolécula; (ii) a troca de tampão no processo de gel filtração não ocorreu de forma completa e parte do manganês do tampão de troca-iônica não fora removido neste processo.

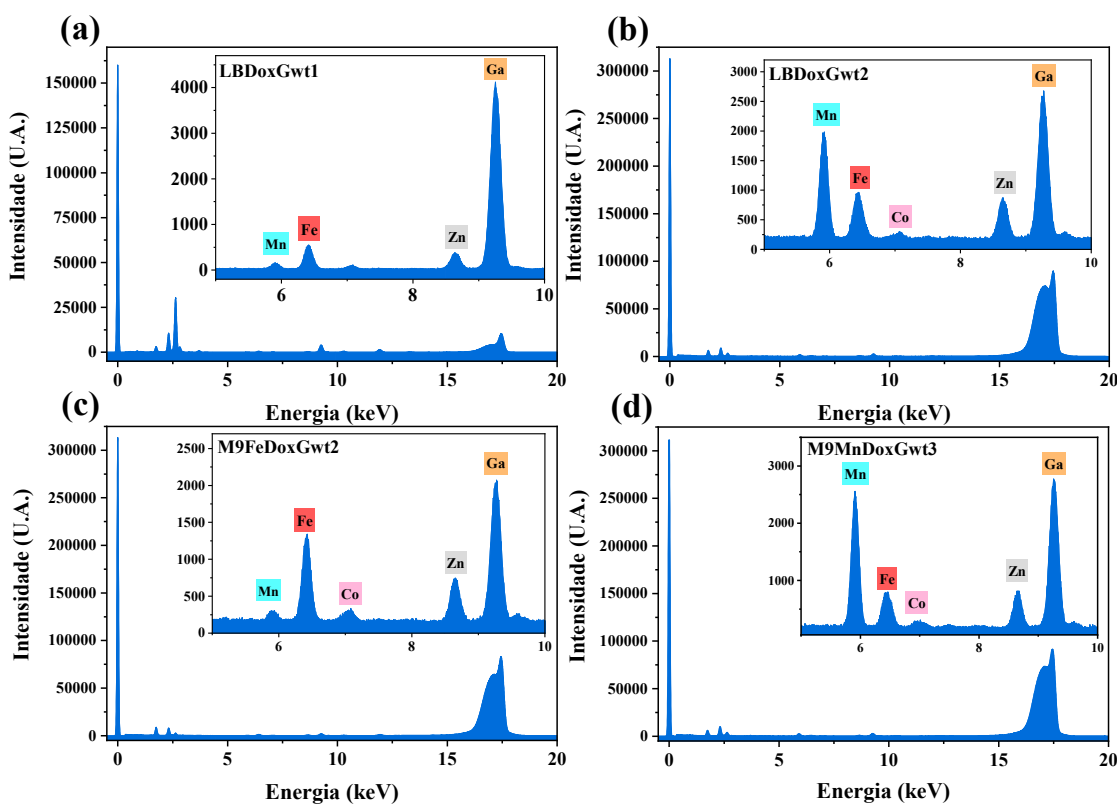


Figura 20: Espectros de TXRF para a DoxG obtida de modo a conter diferentes concentrações dos cátions bivalentes Fe^{+2} e Mn^{+2} (Quadro 1).

No caso da enzima obtida no meio M9 suplementado com excesso de ferro (Figura 20c) observa-se que a presença do mesmo foi mais elevada em relação aos outros cátions. Já quando o manganês foi empregado no processo de expressão e purificação, encontrava-se em maior quantidade em relação aos demais íons (Figura 20d, Quadro 3).

Com o objetivo de avaliar a relação entre a atividade específica das diferentes enzimas com a porcentagem de metais incorporados pelas mesmas durante o processo de superexpressão e purificação construiu-se as relações apresentadas nas Figuras 21 e 22.

Não foi observado nenhuma relação entre o conteúdo de zinco ou cobalto com a atividade específica das enzimas. Já para manganês e ferro observou-se que as enzimas mais ativas foram aquelas que possuíam maiores concentrações destes elementos. Uma vez que durante a reativação, a solução apresentava concentração de Fe^{+2} na ordem de 10^3 vezes maior que a concentração dos cátions nas amostras de proteínas purificadas, é possível inferir que caso estes últimos contribuam para uma enzima mais ativa, provavelmente isso ocorre por um efeito de proteção.

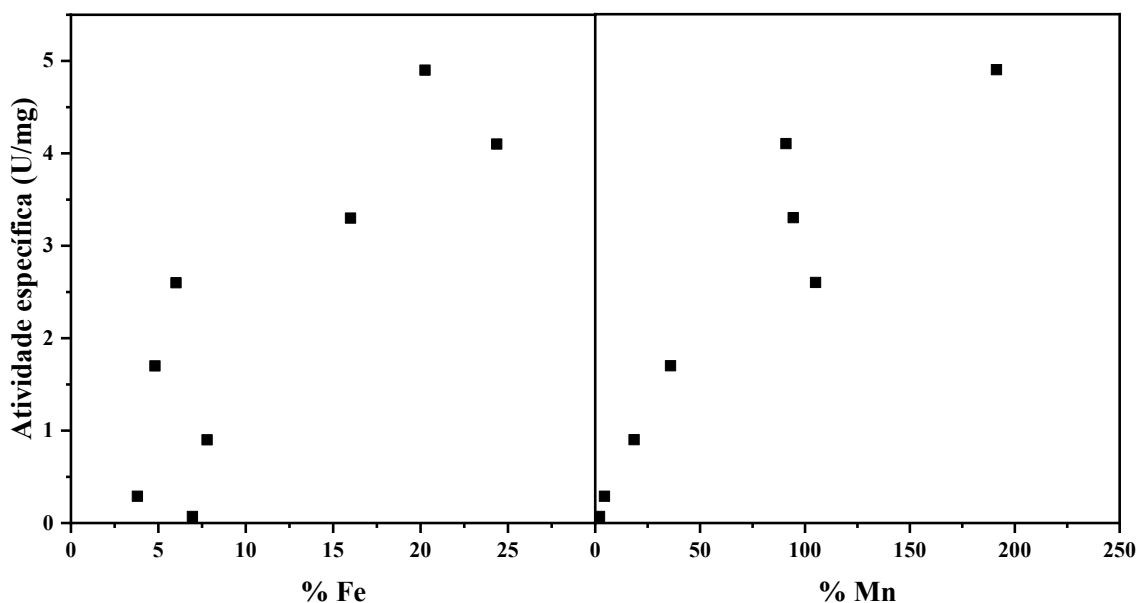


Figura 21: Relação entre a % ferro e de manganês nas amostras da DoxG com a atividade específica após a reativação. Gráficos construídos a partir da correlação entre os dados apresentados na Tabela 3 com os apresentados no Quadro 3.

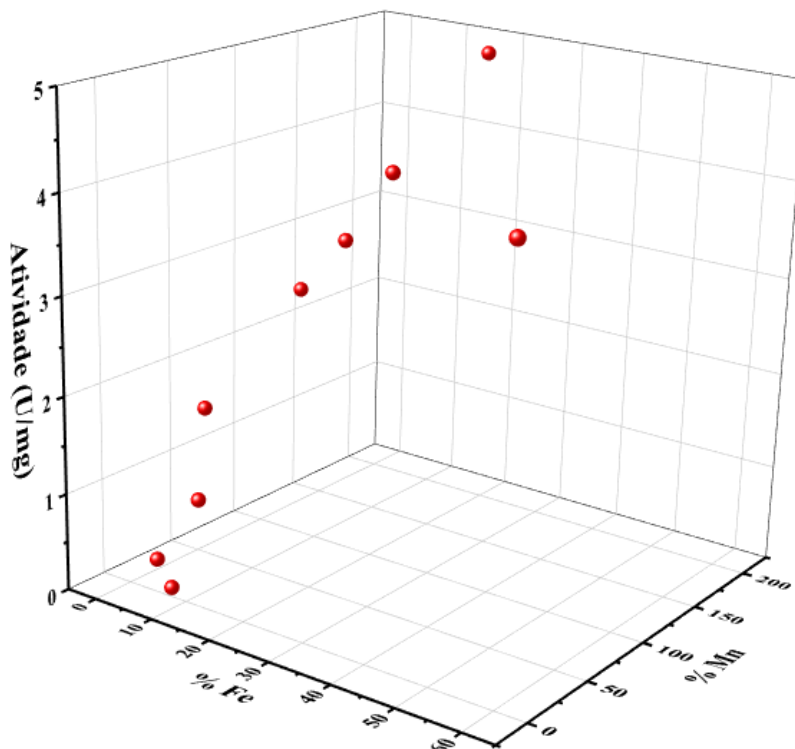


Figura 22: Atividade específica da DoxG em função da porcentagem de ferro e manganês incorporado pela mesma. Gráfico construído a partir da correlação entre os dados apresentados na Tabela 3 com os apresentados no Quadro 3.

Como discutido anteriormente sobre o papel do manganês em conferir maior estabilidade térmica, é provável que o cofator faça a manutenção da estrutura, ajudando, assim, a conservar a atividade da enzima. Todavia, é preciso cautela visto que:

(i) o trabalho de Nozaki e colaboradores (1968) observou-se que uma metapirocatecase que havia sido inativada por agentes oxidantes, como ar ou H_2O_2 , foi quase completamente reativada por agentes redutores e íons ferrosos, o que levou os autores a sugerir que a inativação não foi acompanhada por desnaturação da proteína.

(ii) Diferenças na atividade específica máxima de diferentes amostras de uma extradiol dioxigenase não é algo exclusivo deste trabalho. Uragami e colaboradores (2001) observaram algo semelhante nos estudos conduzidos com a BphC de *Pseudomonas* sp. KKS102, afirmando que essas diferenças poderiam ser oriundas de diferentes fatores, sugerindo que – para o sistema estudado por eles – essa diferença poderia estar associada a fatores como concentração de sulfato e estabilidade da apoenzima.

Além disso, é preciso considerar que pode haver um erro no cálculo da porcentagem de cátions incorporados pela enzima, este seria oriundo do método de Bradford utilizado para medidas de concentração da enzima. Este problema foi relatado no estudo realizado por Whiting e colaboradores (1996) em que os autores discutem que medidas de concentração da 3,4-dihidroxiacetato 2,3-dioxigenase de *Arthrobacter globiformis* – uma extradiol dioxigenase – pelo método de Bradford superestimavam a concentração dessa enzima, o que, conseqüentemente, fazia com que a % de metal calculada fosse inferior ao valor real.

Embora as limitações supracitadas sejam importantes considerações a serem feitas em relação ao estudo do sistema, é notável que existe uma relação com perfil hiperbólico entre as porcentagens de metais incorporados e a atividade específica da enzima (Figura 21). O que indica ser possível que os efeitos protetivos ocorram, o que corroboraria com os resultados do experimento de inativação térmica. Uma investigação mais profunda e aplicada a outras extradiol dioxigenases é uma proposta interessante para futuros estudos.

4.9 Cinética do Estado Estacionário

A enzima foi reativada conforme descrito na seção 4.4 e utilizada para obter os parâmetros de Michaelis–Menten. Os ensaios foram feitos de modo a conter 1% v/v de tetrahydrofurano. Patel e Barnsley (1980) relatam que este solvente orgânico contribui positivamente com a linearidade nos estudos cinéticos conduzidos com a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas putida* NCIB 9816.

Tanto os experimentos de cinética de clivagem dos substratos pela enzima descritos nesta seção quanto nas demais seções do trabalho foram conduzidos em tampão de fosfato de sódio 100 mM saturados com o substrato dioxigênio. É sabido que a velocidade de oxidação do catecol – não enzimática – levando a formação de quinona, é fortemente dependente do pH, sendo significativamente mais rápida em condições alcalinas. Comportamento semelhante é observado para catecois contendo grupos substituintes (Maier, Bernt, & Butler, 2018). Segundo Patel e Barnsley (1980), a 1,2-DHNDO de *Pseudomonas putida* NCIB 9816 aparentemente possui pH ótimo igual a 6,5, mas ressaltam a incerteza sobre este valor visto que, em potenciais hidrogeniônicos mais elevados, a rápida oxidação do substrato leva a formação da 1,2-naftoquinona, um potente inibidor competitivo da enzima. Por esse motivo, o pH 6,5 foi escolhido como condição padrão nos estudos cinéticos.

O substrato 1,2-dihidroxi-naftaleno não foi obtido com sucesso. Utilizou-se a metodologia de Corner e Young (1954) em que a 1,2-naftoquinona foi reduzida em solução 10% m/v de ditionito de sódio formando um precipitado de coloração bronze, que após filtração e recristalização duas vezes em benzeno, levaria ao produto de interesse com elevada pureza. Outra forma de purificação, proposta por Patel e Barnsley (1980), envolve a recristalização do sólido impuro via um processo de ressublimação. Aqui, embora a formação do 1,2-DHN tenha sido observada na solução de ditionito, ambas as estratégias de purificação foram improdutivas. Ao ser filtrado, ainda sobre papel observava-se a transformação do sólido de cor bronze em um sólido escuro, o processo se intensificava quando o sólido era submetido a ressublimação. Já no caso de tentativas de recristalização em solvente orgânico, o tolueno foi utilizado em alternativa ao benzeno. Após se dissolver completamente o sólido, observou-se uma rápida mudança de coloração da solução, indo de castanho-claro a vermelho-escuro – cor característica da 1,2-naftoquinona – indicando a oxidação do produto. Estas observações contrariam as observações de Davies e Evans (1964) que dizem que este composto se oxida rapidamente em soluções aquosas, mas que é estável em solventes orgânicos ou no estado sólido. É possível que outros fatores, tal como a umidade do ar, possam ter contribuído para a transformação do produto de interesse em substâncias indesejadas.

A razão entre a velocidade inicial e a concentração de enzima ($v/[E]$) foi obtida variando-se a concentração de substrato 3-metilcatecol, catecol ou 2,3-dihidroxi-bifenil, respectivamente, Figuras 23, 24 e 25, de modo a obter os parâmetros cinéticos para a clivagem destes substratos pela DoxG. Sendo que o K_m e o k_{cat} foram obtidos a partir do ajuste com a equação de Michaelis-Menten (Equação 5), já a constante de especificidade (k_{cat}/K_m) foi determinada a partir do coeficiente angular do gráfico $v/[E]$ em função da concentração de substrato quando $[S] \ll K_m$.

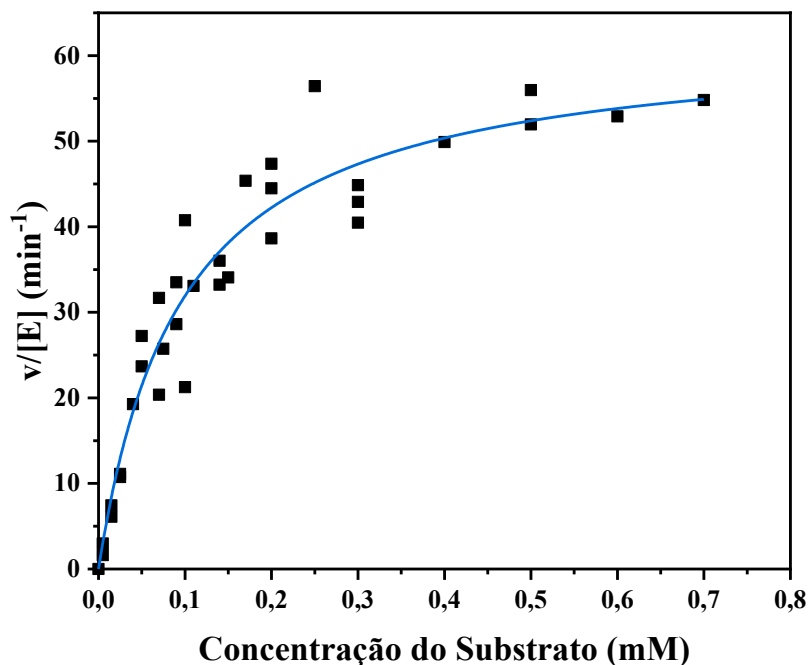


Figura 23: Perfil de Michaelis-Menten para a DoxG em diferentes concentrações de 3-metilcatecol em pH 6,5 e $25,0 \pm 0,1$ °C. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 5). Enzima utilizada M9MnDoxGwt2 e M9MnDoxGwt5.

No trabalho de Fortin e colaboradores (2005a) não foram avaliados os parâmetros cinéticos para a clivagem dos substratos 3-metilcatecol e catecol pela DoxG. Contudo, o K_m para o 3-metilcatecol pela 1,2-DHND0 de *Pseudomonas putida* NCIB 9816 é 0,15 mM no pH de 5,5, já para o catecol, está constante não foi determinada (Patel, & Barnsley, 1980). No presente trabalho, obtivemos os valores de 0,09 e 0,9 mM no pH 6,5 para o 3-metilcatecol e catecol, respectivamente.

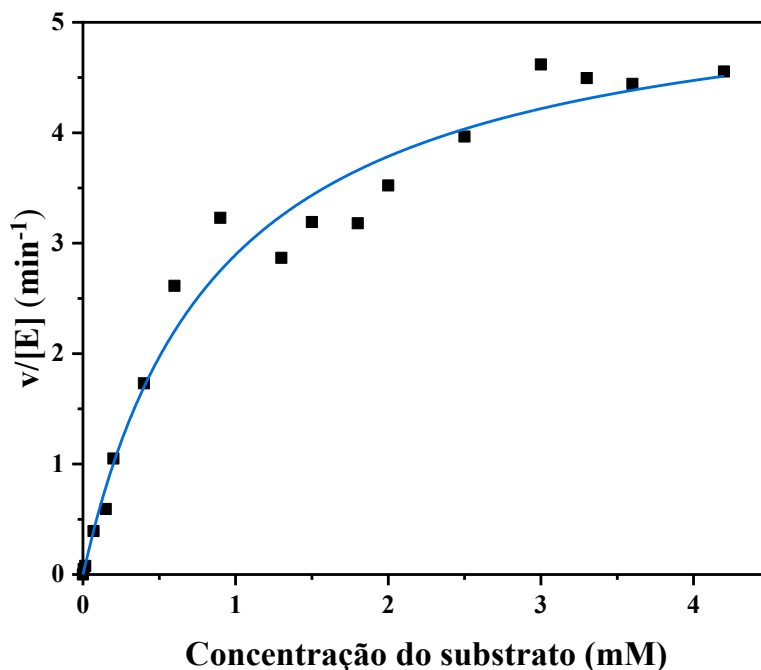


Figura 24: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de catecol em pH 6,5 e $25 \pm 0,1$ °C. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 5). Enzima utilizada M9MnDoxGwt5.

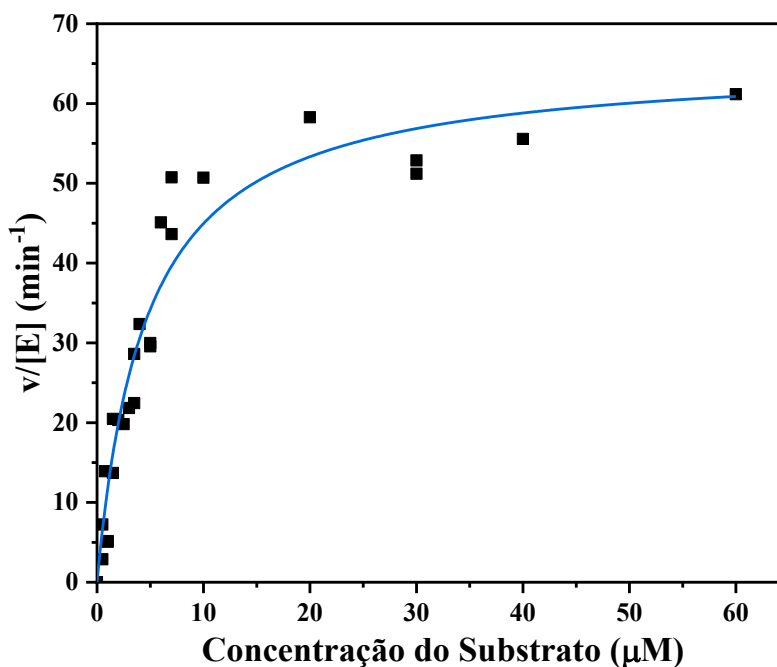


Figura 25: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de 2,3-dihidroxibifenil em pH 6,5 e $25 \pm 0,1$ °C. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 5). Enzima utilizada M9FeDoxGwt2.

A constante de especificidade (k_{cat}/K_m) para a clivagem do 2,3-dihidroxi-bifenil é 10 vezes maior do que a do 3-metilcatecol, que é cerca de 100 vezes maior do que a do catecol (Tabela 4). É possível que isso ocorra devido ao fato de a enzima preferir substratos maiores, visto que possui um sítio ativo volumoso (Neau, 2004). Assim, uma vez que a enzima acomodaria melhor este substrato a catálise ocorreria de forma mais eficiente.

Tabela 4 - Valores das constantes cinéticas obtidas a partir do ajuste não-linear dos dados cinéticos nas Figuras 20, 21, 22 e 23 para a clivagem dos substratos pela DoxG em tampão fosfato 100 mM e $25 \pm 0,1$ °C.

<i>Substrato</i>	K_m^{app} (mM)	k_{cat}^{app} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)
3-metilcatecol (pH 6,5)	0,09 ± 0,01	62 ± 3	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^5$
Catecol (pH 6,5)	0,9 ± 0,1	5,4 ± 0,2	$(6,6 \pm 0,2) \times 10^3$
2,3-dihidroxi-bifenil (pH 6,5)	0,0046 ± 0,0006	65 ± 3	$(7,1 \pm 0,9) \times 10^6$
2,3-dihidroxi-bifenil (pH 7,0)	0,0044 ± 0,0005	36 ± 1	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^6$
2,3-dihidroxi-bifenil (pH 7,0)^a	0,0026	108	$4,08 \times 10^6$

^aDados obtidos por Fortin e colaboradores (2005a).

Com o objetivo de comparar a atividade da DoxG obtida no presente trabalho com resultados já descritos na literatura (Fortin et al., 2005a), obteve-se os parâmetros para a clivagem do 2,3-dihidroxi-bifenil no tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Figura 26, Tabela 4). O fato de o 2,3-dihidroxi-bifenil ser mais estável que o 1,2-dihidroxi-naftaleno permitiu que a cinética no pH 7,0 fosse realizada. O valor da eficiência catalítica (k_{cat}) obtido para a DoxG no presente trabalho foi três vezes inferior ao valor descrito, o que indica que a enzima se encontra um pouco menos ativa. A constante de especificidade (k_{cat}/K_m) apresentou um valor similar. Já o valor de K_m , embora superior, foi bem próximo ao descrito no trabalho de Fortin e colaboradores (2005a).

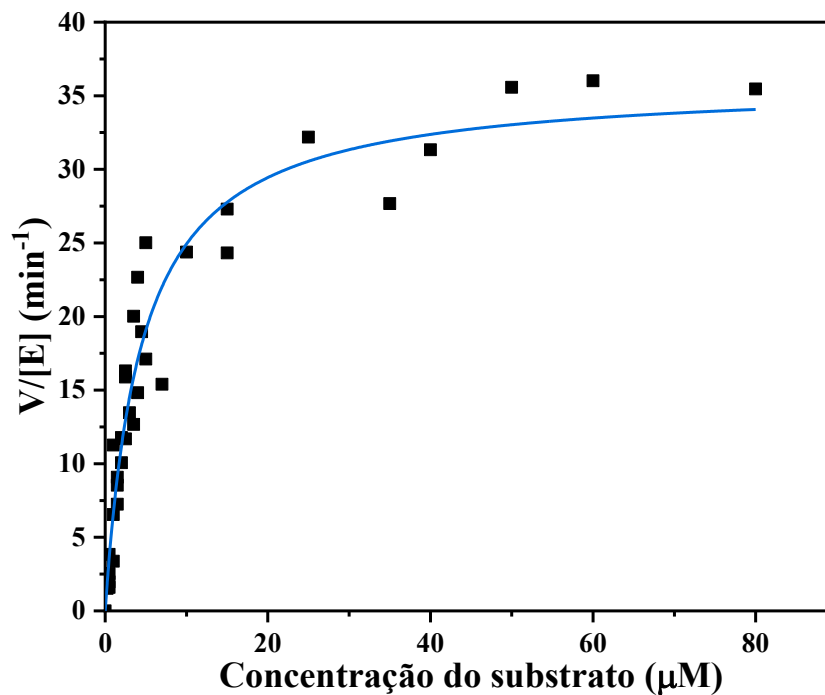


Figura 26: Perfil das cinéticas obtidas para a DoxG em diferentes concentrações de 2,3-dihidroxibifenil em pH 7,0 e $25 \pm 0,1$ °C. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética de Michaelis-Menten (Equação 5). Enzimas utilizadas M9MnDoxGwt2, M9FeDoxGwt2 e LBDoxGwt2.

O valor de k_{cat} para o pH 6,5 é aproximadamente o dobro do valor para o pH 7,0. Esse fato corrobora com os achados de Patel e Barnsley (1980), que sugeriram que o pH ótimo para a 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase encontra-se próximo a 6,5.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, determinou-se os requisitos para a obtenção e utilização da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase (DoxG) sob condições aeróbias. Neste sentido, a enzima foi obtida em larga escala, caracterizada utilizando-se de técnicas de biofísica e reconstituída com relação à atividade enzimática perdida durante a purificação. Estratégias visando alcançar metodologias de catálise mais eficientes e enzimas mais ativas e/ou estáveis também foram empregadas. Além disso, a enzima foi avaliada com relação a sua capacidade em converter diferentes substratos. Em resposta aos objetivos de pesquisa, as seguintes considerações podem ser feitas sobre os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do presente trabalho:

- I. Foi possível estabelecer um protocolo eficiente para purificação da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase em condições aeróbias. Sendo que, as diferentes condições empregadas nos meios de cultura e no processo de purificação resultaram em enzimas contendo diferentes concentrações de íons Fe^{+2} e Mn^{+2} . Apesar das condições influenciarem no percentual de cátions incorporados, há variações na concentração destes em enzimas obtidas sob uma mesma condição. Convém observar que o meio mínimo M9 oferece um maior controle da disponibilidade dos nutrientes para o crescimento celular, contudo o rendimento de células foi inferior ao obtido com o meio Luria-Bertani (LB).
- II. O estado oligomérico em meio aquoso da 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenase foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (EDL) como sendo um octâmero. Esse resultado concorda com o de outros trabalhos (Fortin et al., 2005a; Kuhm et al., 1991) que determinaram a estrutura quaternária dessa proteína.
- III. A reativação da DoxG é um processo complexo influenciado por uma série de fatores: (a) A velocidade de incorporação do Fe^{+2} pela enzima mostrou-se ótima em pH 5,75, sendo um processo extremamente sensível a alterações no pH. Isso porque em meio alcalino a disponibilidade do cofator é limitada devido à formação de outras espécies e em valores de potencial hidrogeniônico mais baixos têm-se a protonação de resíduos de histidinas e do glutamato do sítio ativo, o que dificultaria a formação do complexo enzima-cofator; (b) Não somente o pH, mas também a natureza do tampão influencia nesse processo. O tampão de acetato resultou em uma maior incorporação do que o fosfato em um mesmo pH, fato este associado a disponibilidade do cofator como previamente observado para homogentisato oxidase (Flamm, & Crandall, 1963); (c) A concentração do cofator interfere

na rapidez com que o mesmo será ligado ao sítio catalítico. Concentrações mais elevadas podem tornar a reconstituição de forma mais rápida, entretanto, reações indesejadas podem ocorrer sendo aconselhável evitar sua utilização em excesso; (d) Nas condições em que a enzima foi incubada, cerca de 90% da enzima recuperava sua atividade em até 150 minutos; (e) A força iônica da solução não influencia o processo de reativação, mas a presença de ânions capazes de se complexar ao ferro prejudicam tal processo. Exemplo disso foi o uso do íon sulfato.

- IV. A enzima obtida em meio suplementado com excesso de íons ferrosos tem cerca de 50% da sua atividade perdida durante o processo de purificação devido à perda do cofator, fato este que impede que a mesma seja reativada apenas com ácido ascórbico. Já a enzima contendo o Mn^{+2} não é capaz de clivar o substrato, contudo este íon preserva a estrutura tridimensional da proteína favorecendo a reconstituição com o íon ferroso.
- V. A força iônica não afetou a atividade enzimática. O tolueno não exibiu capacidade de modular a ligação do substrato no sítio ativo, não aumentou a velocidade de reação e nem preveniu a inibição suicida da DoxG durante a clivagem do 3-metilcatecol.
- VI. A estabilidade térmica da DoxG mostrou-se semelhante à de outras extradiol dioxigenases, mantendo-se plenamente ativa após incubada a 50 °C por 40 minutos. Além disso, a presença de íons manganês bivalente conferiu a enzima uma maior resistência a inativação térmica.
- VII. Observou-se uma relação entre a atividade específica da enzima após a reativação e a porcentagem de cátions incorporados pela mesma durante a sua obtenção. Sendo que as mais ativas foram as que apresentaram maiores porcentagens de ferro e/ou manganês – o que indica uma possível manutenção da estrutura por estes íons, fato este que corrobora os resultados obtidos nos experimentos de inativação térmica.
- VIII. A clivagem do substrato 2,3-dihidroxibifenil pela DoxG mostrou-se mais eficiente do que para os substratos catecol e 3-metilcatecol, o que reforça uma preferência da enzima por substratos mais volumosos.

Com base nas observações acima, estudos futuros podem se valer das seguintes perspectivas: (1) Mais experimentos são necessários para avaliar se o papel do cátion manganês na enzima se dá por sua ligação ao sítio ativo ou a alguma outra região da macromolécula; (2) Outros estudos apresentam evidências de que a catálise nas extradiol dioxigenases não depende do

potencial de redução do cofator, sendo necessário entender por qual motivo algumas extradiol dioxigenases são capazes de usar cofatores bivalentes diferentes do Fe^{+2} , enquanto outras não; (3) Por fim, obteve-se evidências de que a presença de íons bivalentes em solução é capaz de conferir maior estabilidade a enzima. Entretanto, como há na literatura tanto evidências que corroboram com os dados apresentados quanto trabalhos que demonstram que o cofator não desempenha papel de manutenção da estrutura de extradiol dioxigenases, é preciso que outras técnicas sejam empregadas visando compreender melhor este processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aken, B. V., Correa, P. A., & Schnoor, J. L. (2010). Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: New trends and promises. *Environmental Science & Technology*, 44(8), 2767–2776. <https://doi.org/10.1021/es902514d>
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental management*, 60(4), 758–783. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>
- Arciero, D. M., & Lipscomb, J. D. (1986). Binding of ^{17}O -labeled substrate and inhibitors to protocatechuate 4,5-dioxygenase-nitrosyl complex. Evidence for direct substrate binding to the active site Fe^{2+} of extradiol dioxygenases. *The Journal of biological chemistry*, 261(5), 2170–2178.
- Arciero, D. M., Orville, A. M., & Lipscomb, J. D. (1985). [^{17}O]Water and nitric oxide binding by protocatechuate 4,5-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase. Evidence for binding of exogenous ligands to the active site Fe^{2+} of extradiol dioxygenases. *The Journal of biological chemistry*, 260(26), 14035–14044.
- Armstrong, R. N. (2000). Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry*, 39(45), 13625–13632. <https://doi.org/10.1021/bi001814v>
- Baldwin R. L. (1996). How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical journal*, 71(4), 2056–2063. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79404-3)
- Bamforth, S., & Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- Barriault, D., Durand, J., Maaroufi, H., Eltis, L. D., & Sylvestre, M. (1998). Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4637–4642. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4637-4642.1998>
- Barney, B. M., Schaab, M. R., LoBrutto, R., & Francisco, W. A. (2004). Evidence for a new metal in a known active site: purification and characterization of an iron-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. *Protein expression and purification*, 35(1), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.01.005>

- Beauchamp, D. L., & Khajepour, M. (2012). Studying salt effects on protein stability using ribonuclease t1 as a model system. *Biophysical chemistry*, *161*, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.11.004>
- Beckham, G. T., Johnson, C. W., Karp, E. M., Salvachúa, D., & Vardon, D. R. (2016). Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Current opinion in biotechnology*, *42*, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.030>
- Boffetta, P., Jourenkova, N., & Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer causes & control: CCC*, *8*(3), 444–472. <https://doi.org/10.1023/a:1018465507029>
- Boldt, Y. R., Sadowsky, M. J., Ellis, L. B., Que, L., Jr, & Wackett, L. P. (1995). A manganese-dependent dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family. *Journal of bacteriology*, *177*(5), 1225–1232. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1225-1232.1995>
- Borowski, T., Georgiev, V., & Siegbahn, P. E. M. (2010). On the observation of a gem diol intermediate after O–O bond cleavage by extradiol dioxygenases. A hybrid DFT study. *Journal of Molecular Modeling*, *16*(11), 1673–1677. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0652-5>
- Borowski, T., Wójcik, A., Miłaczewska, A., Georgiev, V., Blomberg, M. R. A., & Siegbahn, P. E. M. (2012). The alkenyl migration mechanism catalyzed by extradiol dioxygenases: A hybrid DFT study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *17*(6), 881–890. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0904-1>
- Bugg, T. D. H., & Lin, G. (2001). Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: How do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chemical Communications*, *11*, 941–952. <https://doi.org/10.1039/b100484k>
- Cacace, M. G., Landau, E. M., & Ramsden, J. J. (1997). The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly reviews of biophysics*, *30*(3), 241–277. <https://doi.org/10.1017/s0033583597003363>
- Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K.-C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(2), 207–228. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>

- Carpenter, D. O. (2006). Polychlorinated biphenyls (Pcbs): Routes of exposure and effects on human health. *Reviews on Environmental Health*, 21(1), 1–24. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.1.1>
- Cáslavský, J., & Kotlaríková, P. (2005). Analysis of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laser Desorption-Ionisation/Time-of-Flight Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry. In E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, & D. Robert (Eds.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems* (pp. 393-408). Berlin: Springer.
- Catelani, D., Colombi, A., Sorlini, C., & Treccani, V. (1973). Metabolism of biphenyl. 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: The meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochemical Journal*, 134(4), 1063–1066. <https://doi.org/10.1042/bj1341063>
- Cerdan, P., Wasserfallen, A., Rekik, M., Timmis, K. N., & Harayama, S. (1994). Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *Journal of bacteriology*, 176(19), 6074–6081. <https://doi.org/10.1128/jb.176.19.6074-6081.1994>
- Cho, J. H., Jung, D. K., Lee, K., & Rhee, S. (2009). Crystal structure and functional analysis of the extradiol dioxygenase LapB from a long-chain alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas*. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), 34321–34330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031054>
- Cho, H. J., Kim, K., Sohn, S. Y., Cho, H. Y., Kim, K. J., Kim, M. H., Kim, D., Kim, E., & Kang, B. S. (2010). Substrate binding mechanism of a type I extradiol dioxygenase. *The Journal of biological chemistry*, 285(45), 34643–34652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130310>
- Christian, G. J., Ye, S., & Neese, F. (2012). Oxygen activation in extradiol catechol dioxygenases – a density functional study. *Chemical Science*, 3(5), 1600. <https://doi.org/10.1039/c2sc00754a>
- Coligan, J. E. (Org.). (1996). *Current protocols in protein science*. John Wiley and Sons.
- Corner, E. D., & Young, L. (1954). Biochemical studies of toxic agents. VII. The metabolism of naphthalene in animals of different species. *The Biochemical journal*, 58(4), 647–655. <https://doi.org/10.1042/bj0580647>

- Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P., & Que, L. (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models, and intermediates. *Chemical Reviews*, 104(2), 939–986. <https://doi.org/10.1021/cr020628n>
- Cotruvo, J. A., Jr, & Stubbe, J. (2012). Metallation and mismetallation of iron and manganese proteins in vitro and in vivo: the class I ribonucleotide reductases as a case study. *Metallomics: integrated biometal science*, 4(10), 1020–1036. <https://doi.org/10.1039/c2mt20142a>
- Dai, S., Vaillancourt, F. H., Maaroufi, H., Drouin, N. M., Neau, D. B., Snieckus, V., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2002). Identification and analysis of a bottleneck in PCB biodegradation. *Nature Structural Biology*, 9(12), 934–939. <https://doi.org/10.1038/nsb866>
- Dangi, A. K., Sharma, B., Hill, R. T., & Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Critical reviews in biotechnology*, 39(1), 79–98. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1500997>
- Davies, J. I., & Evans, W. C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *The Biochemical journal*, 91(2), 251–261. <https://doi.org/10.1042/bj0910251>
- Darby, J. F., Atobe, M., Firth, J. D., Bond, P., Davies, G. J., O'Brien, P., & Hubbard, R. E. (2017). Increase of enzyme activity through specific covalent modification with fragments. *Chemical science*, 8(11), 7772–7779. <https://doi.org/10.1039/c7sc01966a>
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., & Young, K. D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in Pseudomonas strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6890–6901. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6890-6901.1993>
- de Los Rios, M. A., & Plaxco, K. W. (2005). Apparent Debye-Huckel electrostatic effects in the folding of a simple, single domain protein. *Biochemistry*, 44(4), 1243–1250. <https://doi.org/10.1021/bi0484441>
- Dong, F. M., Wang, L. L., Wang, C. M., Cheng, J. P., He, Z. Q., Sheng, Z. J., & Shen, R. Q. (1992). Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from Bacillus stearothermophilus FDTP-3 and their expression in Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2531–2535. <https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2531-2535.1992>

- Dong, G., Shaik, S., & Lai, W. (2013). Oxygen activation by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: A QM/MM study reveals the key intermediates in the activation cycle. *Chemical Science*, 4(9), 3624. <https://doi.org/10.1039/c3sc51147b>
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>
- Dunwell, J. M., Culham, A., Carter, C. E., Sosa-Aguirre, C. R., & Goodenough, P. W. (2001). Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(12), 740–746. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01981-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01981-8)
- Elgren, T. E., Orville, A. M., Kelly, K. A., Lipscomb, J. D., Ohlendorf, D. H., & Que, L. (1997). Crystal Structure and Resonance Raman Studies of Protocatechuate 3,4- Dioxygenase Complexed with 3,4-Dihydroxyphenylacetate. *Biochemistry*, 36(38), 11504–11513. <https://doi.org/10.1021/bi970691k>
- Eltis, L. D., & Bolin, J. T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5930–5937. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5930-5937.1996>
- Eltis, L. D., Hofmann, B., Hecht, H. J., Lünsdorf, H., & Timmis, K. N. (1993). Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *The Journal of biological chemistry*, 268(4), 2727–2732.
- Emerson, J. P., Kovaleva, E. G., Farquhar, E. R., Lipscomb, J. D., & Que, L., Jr (2008). Swapping metals in Fe- and Mn-dependent dioxygenases: evidence for oxygen activation without a change in metal redox state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7347–7352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711179105>
- Epting, K. L., Vieille, C., Zeikus, J. G., & Kelly, R. M. (2005). Influence of divalent cations on the structural thermostability and thermal inactivation kinetics of class II xylose isomerases. *The FEBS journal*, 272(6), 1454–1464. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04577.x>
- Faroon, O., & Ruiz, P. (2016). Polychlorinated biphenyls: New evidence from the last decade. *Toxicology and Industrial Health*, 32(11), 1825–1847. <https://doi.org/10.1177/0748233715587849>

- Ferraro, D. J., Gakhar, L., & Ramaswamy, S. (2005). Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.222>
- Fielding, A. J., Kovaleva, E. G., Farquhar, E. R., Lipscomb, J. D., & Que, L., Jr (2011). A hyperactive cobalt-substituted extradiol-cleaving catechol dioxygenase. *Journal of biological inorganic chemistry*, 16(2), 341–355. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0732-0>
- Fielding, A. J., Lipscomb, J. D., & Que, L., Jr (2012). Characterization of an O₂ adduct of an active cobalt-substituted extradiol-cleaving catechol dioxygenase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 796–799. <https://doi.org/10.1021/ja2095365>
- Flamm, W. G., & Crandall, D. I. (1963). Purification of mammalian homogentisate oxidase and evidence for the existence of ferrous mercaptans in the active center. *The Journal of biological chemistry*, 238, 389–396.
- Fleming, P. J., & Fleming, K. G. (2018). HullRad: Fast Calculations of Folded and Disordered Protein and Nucleic Acid Hydrodynamic Properties. *Biophysical journal*, 114(4), 856–869. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.01.002>
- Forsgren, A. J. (2015). PAHs in Sewage Sludge, Soils, and Sediments. In A. J. Forsgren. (Eds.). *Wastewater Treatment: Occurrence and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Florida: CRC Press
- Fortin, P. D. (2005c). *Degradation of Polychlorinated Biphenyl (PCB) Metabolites: Directed Evolution and Enzymatic Fortuity*. Ph.D. thesis, British Columbia University.
- Fortin, P. D., Lo, A. T., Haro, M. A., Kaschabek, S. R., Reineke, W., & Eltis, L. D. (2005b). Evolutionarily divergent extradiol dioxygenases possess higher specificities for polychlorinated biphenyl metabolites. *Journal of bacteriology*, 187(2), 415–421. <https://doi.org/10.1128/JB.187.2.415-421.2005>
- Fortin, P. D., MacPherson, I., Neau, D. B., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2005a). Directed evolution of a ring-cleaving dioxygenase for polychlorinated biphenyl degradation. *The Journal of biological chemistry*, 280(51), 42307–42314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510456200>
- Gan, S., Lau, E. V., & Ng, H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of hazardous materials*, 172(2-3), 532–549. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>

- Georgiev, V., Borowski, T., Blomberg, M. R. A., & Siegbahn, P. E. M. (2008). A comparison of the reaction mechanisms of iron- and manganese-containing 2,3-HPCD: An important spin transition for manganese. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(6), 929–940. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0380-9>
- Grimsley, G. R., & Pace, C. N. (2004). Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current protocols in protein science, Chapter 3*. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0301s33>
- Groce, S. L., & Lipscomb, J. D. (2003). Conversion of extradiol aromatic ring-cleaving homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase into an intradiol cleaving enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), 11780–11781. <https://doi.org/10.1021/ja0368103>
- Groce, S. L., & Lipscomb, J. D. (2005). Aromatic ring cleavage by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Role of his200 in the kinetics of interconversion of reaction cycle intermediates. *Biochemistry*, 44(19), 7175–7188. <https://doi.org/10.1021/bi050180v>
- Guengerich, F. P., & Yoshimoto, F. K. (2018). Formation and cleavage of c–c bonds by enzymatic oxidation–reduction reactions. *Chemical Reviews*, 118(14), 6573–6655. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00031>
- Guo, G., Fang, T., Wang, C., Huang, Y., Tian, F., Cui, Q., & Wang, H. (2015). Isolation and characterization of two novel halotolerant Catechol 2, 3-dioxygenases from a halophilic bacterial consortium. *Scientific reports*, 5(17603). <https://doi.org/10.1038/srep17603>
- Habe, H., & Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(2), 225–243. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.225>
- Han, S., Eltis, L. D., Timmis, K. N., Muchmore, S. W., & Bolin, J. T. (1995). Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a pcb-degrading pseudomonad. *Science*, 270(5238), 976–980. <https://doi.org/10.1126/science.270.5238.976>
- Hatta, T., Mukerjee-Dhar, G., Damborsky, J., Kiyohara, H., & Kimbara, K. (2003). Characterization of a novel thermostable Mn(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl- and naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21483–21492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210240200>

- Hoffman, B. J., Broadwater, J. A., Johnson, P., Harper, J., Fox, B. G., & Kenealy, W. R. (1995). Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. *Protein expression and purification*, 6(5), 646–654. <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1085>
- Hong, X., Cao, P., Washio, Y., Simpson, G., Campobasso, N., Yang, J., Borthwick, J., Burton, G., Chabanet, J., Bertrand, S., Evans, H., Young, R. J., Qu, J., Li, H., Cottom, J., Ward, P., Zhang, H., Ho, T., Qin, D., Christensen, S., ... Head, M. S. (2014). Structure-guided optimization of small molecule c-Abl activators. *Journal of computer-aided molecular design*, 28(2), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s10822-014-9731-5>
- Hu, D., & Hornbuckle, K. C. (2010). Inadvertent polychlorinated biphenyls in commercial paint pigments. *Environmental Science & Technology*, 44(8), 2822–2827. <https://doi.org/10.1021/es902413k>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2013). Bitumens and bitumen emissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 103, 9–303.
- Ishida, T., Senda, T., Tanaka, H., Yamamoto, A., & Horiike, K. (2005). Single-turnover kinetics of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase reacting with 3-formylcatechol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.218>
- Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059–2067. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000>
- Kim, E. J., Choi, S. D., & Chang, Y. S. (2011). Levels and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils after forest fires in South Korea. *Environmental science and pollution research international*, 18(9), 1508–1517. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0515-3>
- Kimura, Y., Yu, L. J., Hirano, Y., Suzuki, H., & Wang, Z. Y. (2009). Calcium ions are required for the enhanced thermal stability of the light-harvesting-reaction center core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. *The Journal of biological chemistry*, 284(1), 93–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806840200>

- Klockenkämper, R., & Bohlen, A. (2001). Total-reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey. *Spectrochimica Acta Part B*, 56(11), 2005-2018. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00291-9](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00291-9)
- Kobayashi, T., Ishida, T., Horiike, K., Takahara, Y., Numao, N., Nakazawa, A., Nakazawa, T., & Nozaki, M. (1995). Overexpression of pseudomonas putida catechol 2,3-dioxygenase with high specific activity by genetically engineered escherichia coli. *The Journal of Biochemistry*, 117(3), 614–622. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124753>
- Koehntop, K. D., Emerson, J. P., & Que, L. (2005). The 2-His-1-carboxylate facial triad: A versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(2), 87–93. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0624-x>
- Kojima, Y., Itada, N., & Hayaishi, O. (1961). Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 236, 2223–2228.
- Kotake, T., Matsuzawa, J., Suzuki-Minakuchi, C., Okada, K., Nojiri, H., & Iwata, K. (2016). Purification and partial characterization of the extradiol dioxygenase, 2'-carboxy-2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase, in the fluorene degradation pathway from *Rhodococcus* sp. strain DFA3. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(4), 719–725. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1123605>
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2007). Crystal structures of Fe²⁺ dioxygenase superoxo, alkylperoxo, and bound product intermediates. *Science*, 316(5823), 453–457. <https://doi.org/10.1126/science.1134697>
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2008a). Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nature Chemical Biology*, 4(3), 186–193. <https://doi.org/10.1038/nchembio.71>
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2008b). Intermediate in the o–o bond cleavage reaction of an extradiol dioxygenase. *Biochemistry*, 47(43), 11168–11170. <https://doi.org/10.1021/bi801459q>
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2012). Structural basis for the role of tyrosine 257 of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase in substrate and oxygen activation. *Biochemistry*, 51(44), 8755–8763. <https://doi.org/10.1021/bi301115c>

- Kovaleva, E. G., Rogers, M. S., & Lipscomb, J. D. (2015). Structural basis for substrate and oxygen activation in homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Roles of conserved active site histidine 200. *Biochemistry*, 54(34), 5329–5339. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00709>
- Kuhm, A. E., Stolz, A., Ngai, K. L., & Knackmuss, H. J. (1991). Purification and characterization of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from a bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids. *Journal of bacteriology*, 173(12), 3795–3802. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3795-3802.1991>
- Kuśmierz, M., Oleszczuk, P., Kraska, P., Pałys, E., & Andruszczak, S. (2016). Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biochar-amended soil. *Chemosphere*, 146, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.010>
- Lammel, G. (2015). Polycyclic Aromatic Compounds in the Atmosphere – A Review Identifying Research Needs. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35, 316–329. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.931870>
- Lipscomb, J. D. (2008). Mechanism of extradiol aromatic ring-cleaving dioxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6), 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.11.001>
- Lipscomb J. D., & Orville A. M. (1992). Mechanistic aspects of dihydroxybenzoate dioxygenases. In H. Sigel, A. Sigel. (Eds). *Metal ions in biological systems: Degradation of Environmental Pollutants by Microorganisms and Their Metalloenzymes*, vol 28, (pp 243–298). New York: CRC Press.
- Liu, Y., Tu, N., Xie, W., & Li, Y. (2017). Theoretical investigation on proton transfer mechanism of extradiol dioxygenase. *RSC Advances*, 7(68), 43197–43205. <https://doi.org/10.1039/C7RA08080H>
- Lloyd-Jones, G., Ogden, R. C., & Williams, P. A. (1995). Inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain CB406 by 3,4-dihydroxybiphenyl (4-phenylcatechol). *Biodegradation*, 6(1), 11–17. <https://doi.org/10.1007/BF00702294>
- Maier, G. P., Bernt, C. M., & Butler, A., (2018). Catechol oxidation: considerations in the design of wet adhesive materials. *Biomaterials science*, 6(2), 332–339. <https://doi.org/10.1039/c7bm00884h>

- Maliszewska-Kordybach, B. (1993). The effect of temperature on the rate of disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils, *Environmental Pollution*, 79(1), 15-20. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90172-K](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90172-K)
- Manzetti, S., van der Spoel, E. R., & van der Spoel, D. (2014). Chemical properties, environmental fate, and degradation of seven classes of pollutants. *Chemical Research in Toxicology*, 27(5), 713–737. <https://doi.org/10.1021/tx500014w>
- Marolt, M., & Lüdeke, S., (2019). Studying NAD(P)H cofactor-binding to alcohol dehydrogenases through global analysis of circular dichroism spectra. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 21(4), 1671–1681. <https://doi.org/10.1039/c8cp04869j>
- Mbughuni, M. M., Chakrabarti, M., Hayden, J. A., Bominaar, E. L., Hendrich, M. P., Munck, E., & Lipscomb, J. D. (2010). Trapping and spectroscopic characterization of an FeIII-superoxo intermediate from a nonheme mononuclear iron-containing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16788–16793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010015107>
- Mbughuni, M. M., Chakrabarti, M., Hayden, J. A., Meier, K. K., Dalluge, J. J., Hendrich, M. P., Münck, E., & Lipscomb, J. D. (2011). Oxy intermediates of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Facile electron transfer between substrates. *Biochemistry*, 50(47), 10262–10274. <https://doi.org/10.1021/bi201436n>
- McKay, D. B., Prucha, M., Reineke, W., Timmis, K. N., & Pieper, D. H. (2003). Substrate Specificity and Expression of Three 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* Strain P6. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2944–2951. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2944-2951.2003>
- Meier, K. K., Rogers, M. S., Kovaleva, E. G., Mbughuni, M. M., Bominaar, E. L., Lipscomb, J. D., & Münck, E. (2015). A long-lived Fe(III)-(Hydroperoxo) intermediate in the active site of the h200c variant of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Characterization by Mössbauer, electron paramagnetic resonance, and density functional theory methods. *Inorganic Chemistry*, 54(21), 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01576>
- Mertens, M., Rittmeyer, C., & Kolbesen, B. O. (2001). Evaluation of the protein concentration in enzymes via determination of sulfur by total reflection X-ray fluorescence spectrometry — limitations of the method. *Spectrochimica Acta Part B*, 56(11), 2157-2164. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00294-4](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00294-4)

- Miyazawa, D., Mukerjee-Dhar, G., Shimura, M., Hatta, T., & Kimbara, K. (2004). Genes for Mn(II)-dependent NahC and Fe(II)-dependent NahH located in close proximity in the thermophilic naphthalene and PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: cloning and characterization. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 4), 993–1004. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26858-0>
- Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *The Science of the total environment*, 696, 133971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>
- Morikawa M. (2010). Dioxygen activation responsible for oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbon compounds: current state and variants. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1595–1603. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2715-z>
- Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., & Pritchard, P. H. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In R. L. Crawford, & D. L. Crawford. (Eds.). *Bioremediation: Principles and Applications*. New York: Cambridge University Press.
- Neau, D. B. (2004). *Structural Studies of the 1,2-Dihydroxynaphthalene Dioxygenase, DoxG, Reveal Features that Permit the Cleavage of 4-Substituted Catechols*. Ph.D. thesis, Purdue University.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463, 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Nozaki, M., Ono, K., Nakazawa, T., Kotani, S., & Hayaishi, O. (1968). Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups. *The Journal of biological chemistry*, 243(10), 2682–2690.
- Parales, R. E., & Ju, K. (2011). Rieske-Type Dioxygenases: Key Enzymes in the Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In M. Moo-Young. (Eds). *Comprehensive Biotechnology*, Vol 6, (3a. ed.). (pp. 52-71). Amsterdam, Netherlands: Pergamon.
- Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner, D. J., & Gibson, D. T. (2000). Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *Journal of bacteriology*, 182(6), 1641–1649. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1641-1649.2000>

- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A., & Massacci, A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (Pcbs): State of knowledge and research perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
- Patel, T. R., & Barnsley, E. A. (1980). Naphthalene metabolism by pseudomonads: purification and properties of 1,2-dihydroxynaphthalene oxygenase. *Journal of bacteriology*, 143(2), 668–673. <https://doi.org/10.1128/jb.143.2.668-673.1980>
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), 927–955. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>
- Penning T. M. (1993). Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chemico-biological interactions*, 89(1), 1–34. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)03203-7](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)03203-7)
- Penning T. M. (2014). Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical research in toxicology*, 27(11), 1901–1917. <https://doi.org/10.1021/tx500298n>
- Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D., & Hurley, T. D. (2010). Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature structural & molecular biology*, 17(2), 159–164. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1737>
- Perkins, J. T., Petriello, M. C., Newsome, B. J., & Hennig, B. (2016). Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2160–2172. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4479-6>
- Pieper, D. H., & Seeger, M. (2008). Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2–3), 121–138. <https://doi.org/10.1159/000121325>
- Pornsuwan, S., Maenpuen, S., Kamutira, P., Watthaisong, P., Thotsaporn, K., Tongsook, C., Juttulapa, M., Nijvipakul, S., & Chaiyen, P. (2017). 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*: An Fe(II)-containing enzyme with fast turnover. *PloS one*, 12(2), e0171135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171135>

- Purcaro, G., Moret, S., & Conte, L. S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.041>
- Que, L., Jr, Widom, J., & Crawford, R. L. (1981). 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase. A manganese (II) dioxygenase from *Bacillus brevis*. *The Journal of biological chemistry*, 256(21), 10941–10944.
- Reetz, M. T. (2013). Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34), 12480–12496. <https://doi.org/10.1021/ja405051f>
- Salis, A., Bilanicova, D., Ninham, B. W., & Monduzzi, M. (2007). Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase. *The journal of physical chemistry. B*, 111(5), 1149–1156. <https://doi.org/10.1021/jp066346z>
- Sanvoisin, J., Langley, G. J., & Bugg, T. D. H. (1995). Mechanism of extradiol catechol dioxygenases: Evidence for a lactone intermediate in the 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 117(29), 7836–7837. <https://doi.org/10.1021/ja00134a041>
- Sato, N., Uragami, Y., Nishizaki, T., Takahashi, Y., Sazaki, G., Sugimoto, K., Nonaka, T., Masai, E., Fukuda, M., & Senda, T. (2002). Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving catecholic dioxygenase. *Journal of Molecular Biology*, 321(4), 621–636. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00673-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00673-3)
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Schilling, S., Cynis, H., von Bohlen, A., Hoffmann, T., Wermann, M., Heiser, U., Buchholz, M., Zunkel, K., & Demuth, H. U. (2005). Isolation, catalytic properties, and competitive inhibitors of the zinc-dependent murine glutaminyl cyclase. *Biochemistry*, 44(40), 13415–13424. <https://doi.org/10.1021/bi051142e>
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., & Tao, S. (2013). Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions.

- Environmental science & technology*, 47(12), 6415–6424. <https://doi.org/10.1021/es400857z>
- Shu, L., Chiou, Y.-M., Orville, A. M., Miller, M. A., Lipscomb, J. D., & Que, L. (1995). X-ray absorption spectroscopic studies of the Fe(II) active site of catechol 2,3-dioxygenase. Implications for the extradiol cleavage mechanism. *Biochemistry*, 34(20), 6649–6659. <https://doi.org/10.1021/bi00020a010>
- Sidhu, C., Solanki, V., Pinnaka, A. K., & Thakur, K. G. (2019). Structure Elucidation and Biochemical Characterization of Environmentally Relevant Novel Extradiol Dioxygenases Discovered by a Functional Metagenomics Approach. *mSystems*, 4(6), e00316-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00316-19>
- Siegbahn, P. E. M., & Haefner, F. (2004). Mechanism for catechol ring-cleavage by non-heme iron extradiol dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 8919–8932. <https://doi.org/10.1021/ja0493805>
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Wen-chen, S., Cruder, D. L., Gibson, D. T., & Zylstra, G. J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127(1), 31–37. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90613-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90613-8)
- Simpson, G. L., Bertrand, S. M., Borthwick, J. A., Campobasso, N., Chabanet, J., Chen, S., Coggins, J., Cottom, J., Christensen, S. B., Dawson, H. C., Evans, H. L., Hobbs, A. N., Hong, X., Mangatt, B., Munoz-Muriedas, J., Oliff, A., Qin, D., Scott-Stevens, P., Ward, P., Washio, Y., ... Young, R. J. (2019). Identification and Optimization of Novel Small c-Abl Kinase Activators Using Fragment and HTS Methodologies. *Journal of medicinal chemistry*, 62(4), 2154–2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01872>
- Smith, R. M., Martell, A. E., Motekaitis, R. J., & Standard Reference Data program (National Institute of Standards and Technology). (2004). NIST critically selected stability constants of metal complexes database. Gaithersburg, MD: Standard Reference Data Program, National Institute of Standards and Technology, U.S. Dept. of Commerce.
- Song, B., Cho, J. H., & Raleigh, D. P. (2007). Ionic-strength-dependent effects in protein folding: analysis of rate equilibrium free-energy relationships and their interpretation. *Biochemistry*, 46(49), 14206–14214. <https://doi.org/10.1021/bi701645g>

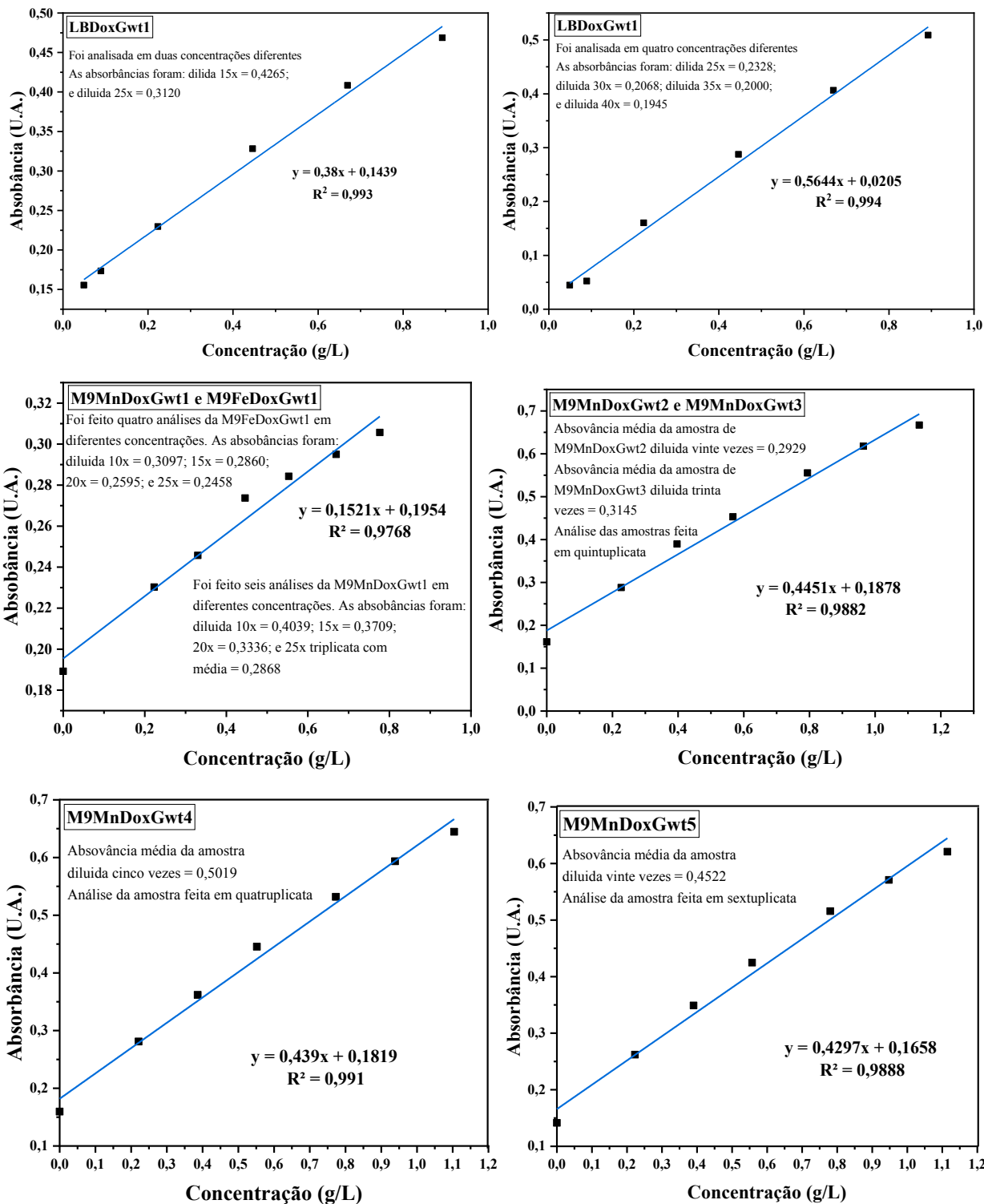
- Spence, E. L., Langley, G. J., & Bugg, T. D. H. (1996). cis – trans isomerization of a cyclopropyl radical trap catalyzed by extradiol catechol dioxygenases: Evidence for a semiquinone intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 118(35), 8336–8343. <https://doi.org/10.1021/ja9607704>
- Srogi K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental chemistry letters*, 5(4), 169–195. <https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>
- Takemori, S., Furuya, E., Mihara, K., & Katagiri, M. (1968). Bovine liver homogentisicase: apoand reconstituted holoenzymes. *European journal of biochemistry*, 6(3), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00462.x>
- Takemori, S., Komiyama, T., & Katagiri, M. (1971). Apo- and reconstituted holoenzymes of metapyrocatechase from *Pseudomonas putida*. *European journal of biochemistry*, 23(1), 178–184. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01606.x>
- Timasheff, S. N. (1992). Solvent effects on protein stability. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 35-39. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90173-5](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90173-5)
- Tzul, F. O., Schweiker, K. L., & Makhatadze, G. I. (2015). Modulation of folding energy landscape by charge-charge interactions: linking experiments with computational modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), E259–E266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410424112>
- Uragami, Y., Senda, T., Sugimoto, K., Sato, N., Nagarajan, V., Masai, E., Fukuda, M., & Mitsu, Y. (2001). Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase. *Journal of inorganic biochemistry*, 83(4), 269–279. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00172-0](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00172-0)
- Vaillancourt, F. H., Barbosa, C. J., Spiro, T. G., Bolin, J. T., Blades, M. W., Turner, R. F. B., & Eltis, L. D. (2002a). Definitive evidence for monoanionic binding of 2,3-dihydroxybiphenyl to 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from uv resonance raman spectroscopy, uv/vis absorption spectroscopy, and crystallography. *Journal of the American Chemical Society*, 124(11), 2485–2496. <https://doi.org/10.1021/ja0174682>
- Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2006). The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267. <https://doi.org/10.1080/10409230600817422>

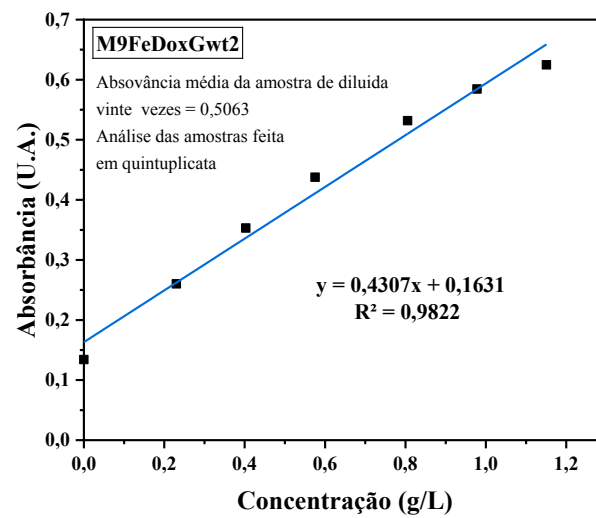
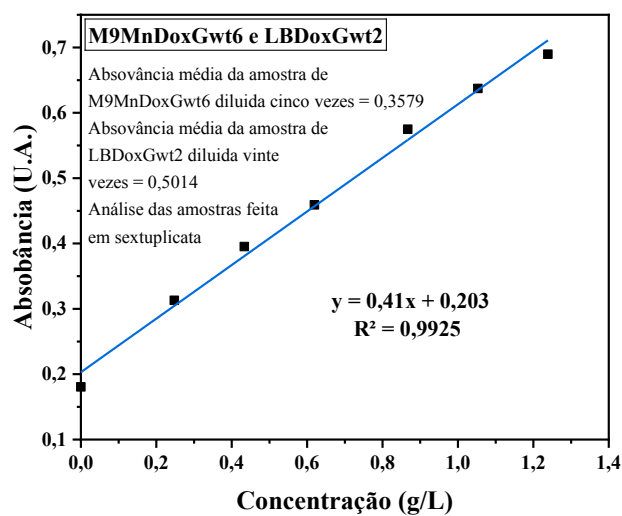
- Vaillancourt, F. H., Fortin, P. D., Labbé, G., Drouin, N. M., Karim, Z., Agar, N. Y. R., & Eltis, L. D. (2005). Molecular basis for the substrate selectivity of bicyclic and monocyclic extradiol dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.219>
- Vaillancourt, F. H., Han, S., Fortin, P. D., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (1998). Molecular basis for the stabilization and inhibition of 2, 3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by t-butanol. *The Journal of biological chemistry*, 273(52), 34887–34895. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34887>
- Vaillancourt, F. H., Haro, M. A., Drouin, N. M., Karim, Z., Maaroufi, H., & Eltis, L. D. (2003). Characterization of extradiol dioxygenases from a polychlorinated biphenyl-degrading strain that possess higher specificities for chlorinated metabolites. *Journal of bacteriology*, 185(4), 1253–1260. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1253-1260.2003>
- Vaillancourt, F. H., Labbe, G., Drouin, N. M., Fortin, P. D., & Eltis, L. D. (2002b). The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by catecholic substrates. *The Journal of biological chemistry*, 277(3), 2019–2027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106890200>
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>
- Vetting, M. W., Wackett, L. P., Que, L., Jr, Lipscomb, J. D., & Ohlendorf, D. H. (2004). Crystallographic comparison of manganese- and iron-dependent homoprotocatechuate 2,3-dioxygenases. *Journal of bacteriology*, 186(7), 1945–1958. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.1945-1958.2004>
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Walker, J. M. (2002). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1592591698>
- Wang, Y., Li, J., & Liu, A. (2017). Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(2–3), 395–405. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1436-5>

- Wang, Y., Shin, I., Fu, Y., Colabroy, K. L., & Liu, A. (2019). Crystal Structures of L-DOPA Dioxygenase from *Streptomyces sclerotialis*. *Biochemistry*, 58(52), 5339–5350. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00396>
- Whiting, A. K., Boldt, Y. R., Hendrich, M. P., Wackett, L. P., & Que, L., Jr (1996). Manganese(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2. *Biochemistry*, 35(1), 160–170. <https://doi.org/10.1021/bi951979h>
- Wild, S. R., & Jones, K. C., (1995). Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 5-12. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120103>
- Wittershagen, A., Rostam-Khani, P., Klimmek, O., Gro, R., Zickermann, V., Zickermann, I., Gemeinhardt, S., Kröger, A., Ludwig, B., Kolbesen, B. O. (1997). Determination of metal-cofactors in enzyme complexes by totalreflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 52(7), 1033–1038. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(96\)01639-4](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(96)01639-4)
- Yang, J., Campobasso, N., Biju, M. P., Fisher, K., Pan, X. Q., Cottom, J., Galbraith, S., Ho, T., Zhang, H., Hong, X., Ward, P., Hofmann, G., Siegfried, B., Zappacosta, F., Washio, Y., Cao, P., Qu, J., Bertrand, S., Wang, D. Y., Head, M. S., ... Oliff, A. (2011). Discovery and characterization of a cell-permeable, small-molecule c-Abl kinase activator that binds to the myristoyl binding site. *Chemistry & biology*, 18(2), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.12.013>
- Zhang, L., Jin, Y., Huang, M., & Penning, T. M. (2012). The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Frontiers in pharmacology*, 3, 193. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00193>
- Zhang, Y., & Tao, S. (2009). Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment*, 43(4), 812–819. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.050>
- Zorn, J. A., & Wells, J. A. (2010). Turning enzymes ON with small molecules. *Nature chemical biology*, 6(3), 179–188. <https://doi.org/10.1038/nchembio.318>

7. ANEXOS

6.1 Anexo I: Resultado dos cálculos das concentrações de proteínas pelo método de Bradford.





6.2 Anexo II: % de metais presentes nas amostras de proteína.

A percentagem do metal em relação a quantidade de proteína foi calculada dividindo a concentração molar do metal na amostra pela concentração molar da enzima na amostra e multiplicando-se o valor por 100.

Ferro:

<i>Enzima</i>	<i>Concentração de ferro na amostra de proteína (mg/L)</i>	<i>% cátion presente na proteína</i>
LBDoxGwt1	1,9825	11,35
LBDoxGwt2	5,75	24,36
M9FeDoxGwt1	0,93	6,95
M9FeDoxGwt2	15,1725	59,05
M9MnDoxGwt1	0,9625	3,8
M9MnDoxGwt2	1,2175	16,0
M9MnDoxGwt3	2,79	20,26
M9MnDoxGwt4	0,2825	4,81
M9MnDoxGwt5	1,2925	6,01
M9MnDoxGwt6	0,2375	7,79

Manganês:

<i>Enzima</i>	<i>Concentração de manganês na amostra de proteína (mg/L)</i>	<i>% cátion presente na proteína</i>
LBDoxGwt1	0,73	4,29
LBDoxGwt2	21,1225	90,98
M9FeDoxGwt1	0,2775	2,11
M9FeDoxGwt2	2,1825	8,63
M9MnDoxGwt1	1,105	4,43
M9MnDoxGwt2	7,0675	94,4
M9MnDoxGwt3	25,9125	191,34
M9MnDoxGwt4	2,075	35,95
M9MnDoxGwt5	22,2125	105,08
M9MnDoxGwt6	0,555	18,52

Cobalto:

<i>Enzima</i>	<i>Concentração de cobalto na amostra de proteína (mg/L)</i>	<i>% cátion presente na proteína</i>
LBDoxGwt1	ND	ND
LBDoxGwt2	ND	ND
M9FeDoxGwt1	ND	ND

M9FeDoxGwt2	ND	ND
M9MnDoxGwt1	ND	ND
M9MnDoxGwt2	1,0425	12,98
M9MnDoxGwt3	0,555	3,82
M9MnDoxGwt4	0,1025	1,65
M9MnDoxGwt5	0,885	3,90
M9MnDoxGwt6	0,05	1,55

Zinco:

<i>Enzima</i>	<i>Concentração de zinco na amostra de proteína (mg/L)</i>	<i>% cátion presente na proteína</i>
LBDoxGwt1	0,9275	4,54
LBDoxGwt2	4,5375	16,42
M9FeDoxGwt1	0,3425	2,19
M9FeDoxGwt2	4,6525	15,47
M9MnDoxGwt1	0,4975	1,68
M9MnDoxGwt2	3,2125	36,06
M9MnDoxGwt3	3,11	19,29
M9MnDoxGwt4	0,43	6,26
M9MnDoxGwt5	6,5325	25,97
M9MnDoxGwt6	0,425	11,91