



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LUIZ HENRIQUE DA COSTA SOUZA**

**ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA EXTREMÓFILA**  
**HGbI (*HELL'S GATE GLOBIN I*)**

**FORTALEZA**

**2020**

LUIZ HENRIQUE DA COSTA SOUZA

ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA EXTREMÓFILA HGbI  
(*HELL'S GATE GLOBIN I*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Izaura Cirino Nogueira Diógenes.  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S239e Souza, Luiz Henrique da Costa.  
Estudo espectroeletroquímico da hemeproteína extremófila HGbI (Hell's Gate Globin I) / Luiz Henrique da Costa Souza. – 2020.  
67 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.  
Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
1. Hemeproteínas. 2. Proteínas extremófilas. 3. Hell's Gate Globin. 4. Espectroeletroquímica. I. Título.  
CDD 540
-

LUIZ HENRIQUE DA COSTA SOUZA

ESTUDO ESPECTROELETROQUÍMICO DA HEMEPROTEÍNA EXTREMÓFILA HGbI  
(HELL'S GATE GLOBIN I)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Izaura Cirino Nogueira Diógenes.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa

Aprovado em: 06/11/2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Izaura Cirino Nogueira de Diógenes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Nunes Correia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Idalina Maria Moreira de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Maria e Luiz, por sempre me incentivarem a seguir estudando, apesar de todas as dificuldades.

Aos orientadores, professora Izaura e professor Eduardo, pela orientação, disponibilidade e apoio na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, bem como na enorme contribuição em minha formação acadêmica.

Aos colegas e amigos do grupo de bioinorgânica, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Agradecimento especial para o Giamwenberg, pelos aprendizados transmitidos sobre espectroeletróquímica e ao Wellinson, pela valorosa ajuda nas etapas de expressão e purificação da proteína.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Anderson Diógenes, por sempre me ajudar, me apoiar, incentivar. Sem sua ajuda esse trabalho não teria sido concluído. Aos meus amigos, Luane e Alessandro, que sempre estiveram próximos, apesar da distância, e sempre me apoiaram a concluir esse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) pela estrutura disponibilizada para a realização da pesquisa.

A todos que de maneira direta ou indireta tornaram esse trabalho possível.

## RESUMO

Dentre as globinas identificadas no microrganismo *Methylophilum infernorum*, um metanotrofo que sobrevive em condições extremas de temperatura e pH, tem-se a *Hell's Gate Globin I* (HGbI), uma hemeproteína que apresenta características peculiares, como estabilidade em pH 2,8, hexacoordenação no estado Fe<sup>II</sup> dependente do pH e uma capacidade anômala de coordenação do íon acetato ao grupo heme. Apesar da função fisiológica dessa proteína no microrganismo permanecer não identificada, sabe-se que há interações com o íon Fe<sup>III/II</sup> no grupo heme e que estas dependem do estado de oxidação. Este trabalho teve como objetivo a determinação do potencial redox do ponto médio ( $E_m$ ) da proteína HGbI na ausência e na presença de ligantes (cianeto, imidazol, monóxido de carbono, acetato e oxigênio) em soluções de diferentes valores de pH. Para tanto, procedeu-se o estudo espectroeletroquímico onde a técnica de espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) foi acoplada à técnica de eletrólise a potencial controlado usando-se uma célula espectroeletroquímica de camada delgada contendo, além da proteína, diferentes mediadores redox. Os valores de  $E_m$  determinados foram: -307, -330, -501, -313, -312 mV vs eletrodo padrão de hidrogênio (EPH) na ausência de ligantes e na presença de imidazol, cianeto, oxigênio e acetato, respectivamente. As medidas em meio contendo CO apresentaram histerese com valores de potenciais de oxidação e redução de 358 e -182 mV vs EPH, respectivamente. Os testes catalíticos em relação à reação de redução de acetato foram monitorados por UV-Vis em soluções de pH 5 e 8, sendo observadas alterações espectrais apenas em meio ácido. A mudança no perfil espectral foi atribuída à geração de um novo composto resultante da redução do acetato. Os experimentos espectroeletroquímicos em soluções de diferentes valores de pH, além de permitir a determinação do pKa (6,9; meio sem ligantes exógenos), forneceram indícios para a sugestão do resíduo lisina como sexto ligante. Os resultados obtidos, em conjunto com dados da literatura, reforçam que a função fisiológica da proteína HGbI está associada ao estado redox do átomo de ferro e que esta não atua no armazenamento ou transporte de oxigênio no microrganismo *Methylophilum infernorum*. Experimentos adicionais para confirmação do sexto ligante e elucidação do mecanismo de redução do acetato precisam ser realizados a fim de contribuir para o entendimento da função fisiológica da proteína HGbI.

**Palavras-chave:** hemeproteínas; proteínas extremófilas; Hell's Gate Globin; espectroeletroquímica.

## ABSTRACT

Among the globins identified in the microorganism *Methylophilum infernorum*, a methanotroph that survives under extreme temperature and pH conditions, there is the *Hell's Gate Globin I* (HGbl), a hemeprotein that present peculiar features, like stability in pH 2.8, pH-dependent hexacoordination in the reduced state ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), and an anomalous ability to coordinate acetate ion to the heme group. Despite the biological function of HGbl in the microorganism remains unsolved it is known there are interactions with the  $\text{Fe}^{\text{III/II}}$  ion of the heme group which are dependent on the oxidation state. This work aimed the determination of the midpoint redox potential ( $E_m$ ) of the HGbl protein in the absence and presence of relevant molecules (cyanide, imidazole, carbo monoxide, acetate and oxygen) in solution of different pH values. For that, a spectroelectrochemical study was performed where the techniques electronic absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible regions and electrolysis at controlled potential were coupled by using a thin layer spectroelectrochemical cell containing, besides the protein, different redox mediators. The determined  $E_m$  values were as follows: 307, -330, - 501, -313 and -312 mV *vs* standard hydrogen electrode (SHE) in the absence and presence of imidazole, cyanide, oxygen and acetate, respectively. The measurements in medium containing CO showed hysteresis with oxidation and reductions potentials at 358 and -182 mV *vs* SHE, respectively. The catalytic assays in respect to the reduction reaction of acetate were monitored by UV-Vis in solutions of pH 5 and 8, with spectral changes being observed only in acid medium. The change in the spectral profile was assigned to the generation of a new compound resultant of acetate reduction. The spectroelectrochemical experiments in solutions of different pH values, besides allowed the determination of pKa (6.9; in the absence of ligand), provide support for suggesting lysine as the sixth ligand. The obtained results, in conjunction with the literature, reinforce the physiological function of HGbl is associated to the oxidation state of the iron atom and that it is not involved in the storage nor in the transport of oxygen in the *Methylophilum infernorum* microorganism. Further studies are required for the confirmation of the sixth ligand as well as for the elucidation of the mechanism of the acetate reduction aiming to contribute for the understanding of the physiological function of HGbl.

**Keywords:** hemeprotein; extremophile proteins; Hell's Gate Globin; spectroelectrochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema ilustrativo contendo o grupo prostético heme b nas formas livre e em uma hemeproteína.....	14
Figura 2 –	Representação ilustrativa das regiões proximal e distal no grupo heme de hemeproteína .....	15
Figura 3 –	Perfil espectroscópico ilustrativo de hemeproteínas hexacoordenadas na forma reduzida e ligadas a resíduo de aminoácido e CO .....	16
Figura 4 –	Comparação estrutural entre os padrões de enovelamento 3/3 (A) e 2/2 (B) na família das globinas.....	17
Figura 5 –	Perfis ilustrativos dos espectros eletrônicos da HGbI no estado reduzido (FeII, desoxi-HGbI) em condição ácida (pH 5,0) e em condição básica (pH 9,0) .....	18
Figura 6 –	Complexos de ferro e cobalto que podem atuar como mediadores em titulação potenciométrica e de seus respectivos valores de potencial formal em mV .....	21
Figura 7 –	Etapas de purificação da proteína HGbI .....	23
Figura 8 –	Esquema ilustrativo (fora de escala) da técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) .....	25
Figura 9 –	Célula espectroeletroquímica OTTLE utilizada nos experimentos. A) Célula espectroeletroquímica montada. B) I. Cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm. II. Eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl(sat) (196 mV vs EPH). III. Eletrodo de trabalho composto por uma malha fina de platina. IV. Contra-eletrodo de platina .....	27
Figura 10 –	Perfil espectroscópico da proteína HGbI (7 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ) em tampão pH 8 tris 50 mmol L <sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup> nas formas oxidada e reduzida. A) Espectros eletrônicos de absorção nas regiões do UV-Vis das formas oxidada (A) e reduzida (B) da proteína HGbI após oxidação e redução química utilizando hexacianoferrato(III) e ditionito de sódio, respectivamente.....	30
Figura 11 –	Etapas realizadas para obtenção e tratamento dos dados referentes as titulações espectroeletroquímicas realizadas. ....	31



- Figura 12 – Purificação da proteína HGbI em coluna de afinidade de íons Ni<sup>2+</sup>. A) Coluna de níquel carregada com a proteína HGbI. B) Esquema ilustrativo da eluição da proteína na coluna (fração vermelha) após a adição de soluções 50, 70, 100 e 125 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol ..... 33
- Figura 13 – Perfil de purificação da proteína HGbI. A) Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo as etapas de purificação da proteína. Poços: 1- Marcador molecular utilizado como padrão; 2- Fração solúvel (citossol); 3- Precipitação com sulfato de amônio. 4- Primeira diálise após precipitação com sulfato de amônio. 5- Fração eluída da coluna de afinidade de Níquel. 6- Segunda diálise após coluna de níquel. B) Espectro eletrônico obtido a partir de uma fração da proteína coletada ao fim da purificação em Tris 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0. .... 34
- Figura 14 – Titulação espectroeletroquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na ausência de ligantes. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30 μmol L<sup>-1</sup>) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão tris (pH 8,0) e NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> contendo os mediadores de A a F (25 μmol L<sup>-1</sup>). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGbI (vermelho) e desoxi-HGbI (preto) ..... 36
- Figura 15 – Titulação espectroeletroquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na presença de imidazol. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30 μmol L<sup>-1</sup>) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão tris (pH 8,0) e NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> contendo os mediadores de A a F (25 μmol L<sup>-1</sup>) e imidazol (50 mmol L<sup>-1</sup>) Inserção: Variação da absorvância em 411 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas imz-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho). .... 40
- Figura 16 – Perfil espectroscópico da proteína HGbI nas condições oxidada e reduzida após remoção da coluna de afinidade com variação do pH. A) met-HGbI na ausência (linha vermelha) e presença de imidazol (linha

- roxa). B) desoxi-HGbI na ausência (linha preta) e na presença de imidazol (linha azul) ..... 41
- Figura 17 – Titulação espectroeletroquímica da proteína HGbI em meio aeróbico. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores A a F (25  $\mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 411 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho) ..... 43
- Figura 18 – Titulação espectroeletroquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na ausência de ligantes. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 9,5) e NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A a F (25  $\mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho) ..... 44
- Figura 19 – Titulação espectroeletroquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na presença do ligante cianeto. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 9,5) e NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A a F (25  $\mu\text{mmol L}^{-1}$ ) e NaCN 4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Inserção: Variação da absorvância em 415 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas cianomet-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho) ..... 45
- Figura 20 – Titulação espectroeletroquímica da proteína HGbI em meio anaeróbico saturado de CO. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A a H (25  $\mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo

	(■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas CO-HGbI (preto) e met-HGbI (vermelho) .....	47
Figura 21 –	Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na presença de acetato 4 mmol L-1. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30 $\mu$ mol L-1) durante a titulação potenciométrica em uma solução 50 mmol L-1 de tampão tris (pH 8,0) e NaCl 100 mmol L-1 contendo os mediadores A a F (25 $\mu$ mmol L-1) acetato 10mmol L-1. Inserção: Variação da absorbância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho) .....	49
Figura 22 –	A) Espectros eletrônicos da proteína HGbI (30 $\mu$ mol L-1) em função do potencial aplicado em uma solução 50 mmol L-1 de tampão acetato (pH 5,0) contendo os mediadores A a F (25 $\mu$ mmol L-1). B) Variação da absorbância da Soret (406nm) da proteína em função do potencial .....	51
Figura 23 –	Oxidação da proteína HGbI 7 $\mu$ mol L-1 em meio anaeróbico em tampão acetato 100 mmol L-1 em pH 5. A) Acompanhamento espectroscópico da oxidação da proteína durante 24 horas. Inserção: Acompanhamento das absorbâncias das bandas em 422 (desoxi-HGbI) e 406nm (Act-HGbI) em função do tempo. B) Perfis espectroscópicos obtidos para a HGbI na forma reduzida (preto) e na forma oxidada ligada a acetato (vermelho). Inserção: Bandas Q referentes a forma reduzida da proteína no início do experimento (preto) e referente a forma oxidada ligada a acetato (vermelho) ao final do experimento .....	52
Figura 24 –	Proposta de ciclo catalítico para HGbI na presença de acetato.....	53
Figura 25 –	Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na ausência de ligantes e em soluções de diferentes valores de pH. Variações espectroscópicas da proteína HGbI (30 $\mu$ mol L-1) durante a titulação potenciométrica em uma solução contendo NaCl 100 mmol L-1 e os mediadores A a F (25 $\mu$ mmol L-1) em 50 mmol L-1 de tampão tris pH 9,5 (A); 9,0 (B); 8,0 (C); 7,0 (D); 6,0 (E) e 3,5 (F). Inserções: Variação da absorbância através da Soret em função do potencial nos sentidos redutivo (●) e oxidativo (■). .....	55

Figura 26 –	Perfil do potencial do ponto médio (Em) da proteína HGbI versus pH do meio.....	57
Figura 27 –	Esquema ilustrativo que representa a influência do equilíbrio envolvendo uma possível água na posição distal da heme proteína no valor de potencial do ponto médio ao modificar o pH do meio. ....	57
Figura 28 –	Perfis espectroscópicos obtidos para as formas totalmente oxidada (em vermelho) e totalmente reduzida (em preto) nas titulações espectroeletróquímicas realizadas em pH 3.5 e 9.5. ....	58
Figura 29 –	Esquema ilustrativo representando a influência do resíduo endógeno da HGbI no potencial do ponto médio. ....	59
Figura 30 –	Esquema ilustrativo que representa o equilíbrio envolvendo o possível ligante lisina para a HGbI na forma reduzida. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de $E_{1/2}$ dos compostos utilizados como mediadores redox nas titulações espectroeletroquímicas.....	28
Tabela 2 -	Condições experimentais para determinação dos valores de $E_m$ da proteína HGbI.....	28
Tabela 3 -	Condições experimentais para determinação dos valores de $E_m$ da proteína HGbI na ausência de ligantes.....	29
Tabela 4 -	Equações químicas sugeridas para a titulação espectroeletroquímica na ausência de ligantes exógenos nos sentidos oxidativo e redutivo.....	37
Tabela 5 -	Valores de potencial do ponto médio ( $E_m$ ) para proteínas hexacoordenadas.....	38
Tabela 6 -	Equações químicas sugeridas para a titulação espectroeletroquímica na presença do ligante cianeto nos sentidos oxidativo e redutivo.....	45
Tabela 7 -	Valores de $E_m$ calculados para a HGbI e os valores correspondentes as bandas Soret e bandas $\beta$ e $\alpha$ nas condições estudadas.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

CooA	Proteína sensora de CO <i>oxidation activator</i>
C-terminal	Porção carboxi terminal
DevS	<i>Differentially expressed in virulent strain sensor protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	Bactéria <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPH	Eletrodo padrão de hidrogênio
$E_m$	Potencial de ponto médio
Eox	Potencial de oxidação
Ered	Potencial de redução
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
His	Histidina
Imz	Imidazol
$K_d$	Constante de dissociação
Lys	Lisina
Met	Metionina
N-terminal	Porção amino terminal
OD	Densidade óptica
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
Rz	Razão de pureza
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
Tris	Hidroximetil-aminometano
UV-Vis	Ultravioleta – visível

## SUMÁRIO

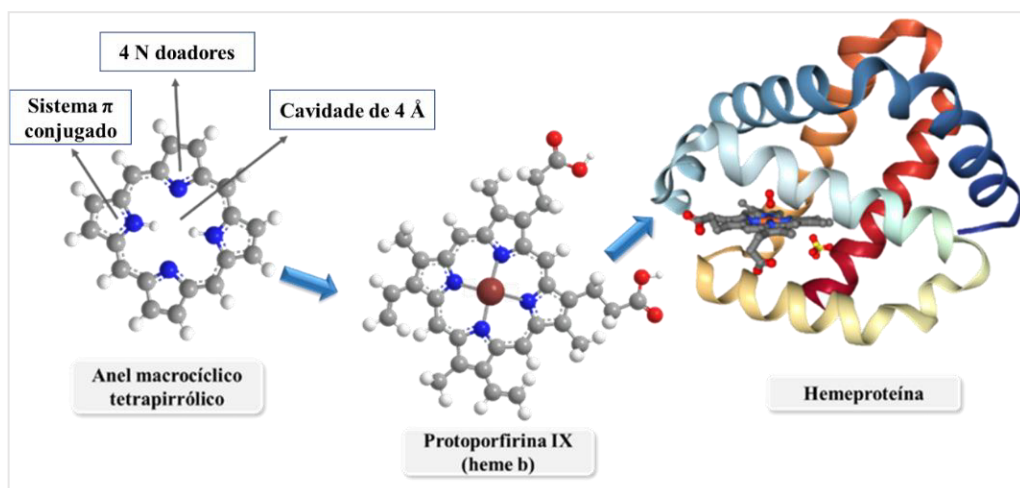
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>HGbI (<i>Hells Gate Globin I</i>)</b> .....	17
<b>1.2</b>	<b>Eletroquímica de Hemeproteínas</b> .....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Expressão e purificação da proteína HGbI</b> .....	23
<b>3.1.1</b>	<i>Partição das células</i> .....	23
<b>3.1.2</b>	<i>Precipitação com sulfato de amônio</i> .....	24
<b>3.1.3</b>	<i>Isolamento em coluna cromatográfica de afinidade</i> .....	24
<b>3.1.4</b>	<i>Eletroforese em gel</i> .....	26
<b>3.2</b>	<b>Espectroeletróquímica</b> .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Purificação da Hell's Gate Globin I</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Influência dos ligantes no valor de <math>E_m</math></b> .....	35
<b>4.2.1</b>	<i>Desoxi-HGbI</i> .....	35
<b>4.2.2</b>	<i>Imz-HGbI</i> .....	39
<b>4.2.3</b>	<i>Oxi- HGbI</i> .....	42
<b>4.2.4</b>	<i>Cianomet – HGbI</i> .....	43
<b>4.2.5</b>	<i>CO – HGbI</i> .....	46
<b>4.2.6</b>	<i>Espectroeletróquímica na presença de acetato</i> .....	49
<b>4.2.7</b>	<i>Testes catalíticos de redução de acetato pela proteína HGbI</i> .....	52
<b>4.3</b>	<b>Influência do pH no valor de <math>E_m</math></b> .....	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade dos organismos vivos de realizar reações redox é um elemento essencial à vida. Nesse sentido, proteínas capazes de experimentar reações de transferência eletrônica devido à presença de íons metálicos em sua estrutura assumem papel fundamental em processos bioquímicos necessários para o pleno funcionamento metabólico dos seres vivos.

Dentre essas biomoléculas se destacam a classe das hemoproteínas que possuem em sua estrutura um grupo prostético, denominado heme, que contém no centro um íon ferro (II ou III). Essas proteínas estão presentes nos mais diversos seres vivos e podem atuar em reações de transferência eletrônica, no transporte (hemoglobina) e armazenamento de gases (mioglobina), catálise (citocromo P450) e como sensoras de pequenas moléculas (FixL) [1,2]. Conforme ilustração da Figura 1, o grupo heme do tipo b (protoporfirina IX) se caracteriza por possuir uma estrutura geral de um anel macrocíclico tetrapirrólico e no centro desse macrocíclico, uma cavidade de aproximadamente 4 Å, apresenta-se coordenado a um íon de Fe (II ou III) que pode experimentar reações redox. A alta afinidade da porfirina por este metal se deve ao efeito macrocíclico, devido à presença de quatro nitrogênios em que o metal se coordena de maneira estável resultando em menor flexibilidade [3].

Figura 1 - Esquema ilustrativo contendo o grupo prostético heme b nas formas livre e em uma hemoproteína.



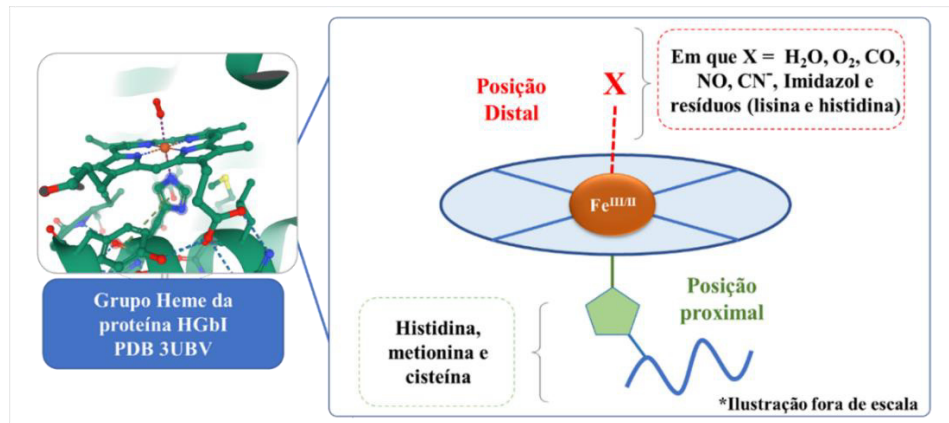
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A coordenação do anel porfirínico ao ferro deixa livre, ainda, dois sítios de coordenação no eixo z conhecidos, respectivamente, como posições proximal e distal, ilustrados na Figura 2. Geralmente, o quinto sítio de coordenação, localizado na posição



proximal, é ocupado por resíduos de histidina, cisteína ou metionina provenientes da própria estrutura proteica. A posição distal, por sua vez, pode ser ocupada por ligantes exógenos como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}$ , imidazol ou  $\text{CN}^-$ , embora ligantes endógenos, tais como histidina e lisina, também possam participar.

Figura 2 - Representação ilustrativa das regiões proximal e distal no grupo heme de hemoproteína.

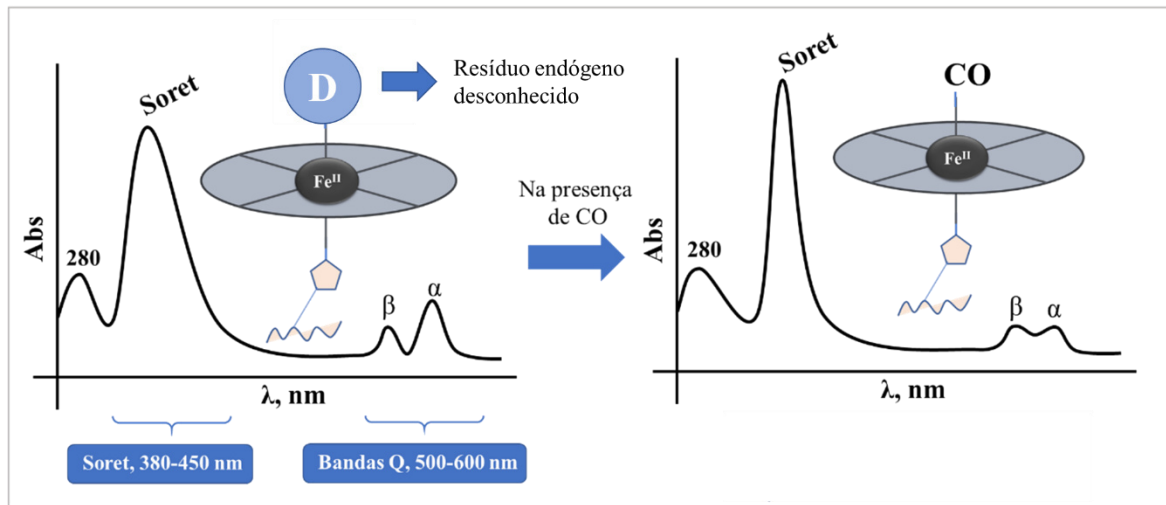


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Apesar dos grupos hemes se apresentarem na natureza de diversas formas, estes diferem em função do tipo de substituinte na porção externa ao anel. Os tipos de grupos hemes mais recorrentes são aqueles dos tipos b e c que se ligam à cadeia polipeptídica das proteínas de maneira não covalente e covalente, respectivamente. A versatilidade do grupo heme se deve a capacidade de alterar suas propriedades em função do microambiente da proteína, modificando sua reatividade em função das interações do íon ferro com ligantes externos na posição distal, da acessibilidade a ligantes externos e da distribuição de carga na região em que se localiza [4].

As características espectroscópicas que o grupo heme apresenta facilitam o estudo deste tipo de sistema, visto que essas bandas fornecem informações estruturais sobre a proteína, uma vez que são sensíveis ao estado de oxidação do metal, aos ligantes que se coordenam ao ferro e a possíveis modificações conformacionais da cadeia polipeptídica [5]. O espectro eletrônico de uma hemoproteína, geralmente, é composto por três regiões (Figura 3) [6,7]: (i) uma banda em  $\sim 280$  nm referente aos resíduos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina e que correspondem a medição de concentração total de proteínas; (ii) banda Soret, de 380 a 450 nm e (iii) bandas Q (que se subdividem em  $\beta$  e  $\alpha$ ) na região de 500 a 600 nm. As bandas Soret e Q estão associadas às transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  referentes ao anel porfirínico [6].

Figura 3 - Perfil espectroscópico ilustrativo de hemoproteínas hexacoordenadas na forma reduzida e ligadas a resíduo de aminoácido e CO.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As bandas  $\beta$  e  $\alpha$  podem fornecer informações relevantes sobre o estado de coordenação desses sistemas. Por exemplo, hemoproteínas hexacoordenadas com resíduos de aminoácido nas posições proximal e distal na forma reduzida apresentam o perfil característico [8,9] em que a banda  $\beta$  apresenta menor intensidade em relação a  $\alpha$ , similar ao espectro ilustrativo apresentado na Figura 3. Na presença de CO, que se coordena ao íon  $\text{Fe}^{\text{II}}$  no centro do grupo heme, entretanto, esse perfil se modifica. Nessa condição, além da Soret apresentar uma redução na largura de banda tornando-a mais fina, as bandas  $\beta$  e  $\alpha$  apresentam intensidades similares. Dessa forma, a análise das alterações espectrais, tanto na região da Soret como das bandas Q, pode ser utilizada para verificar em que condição se encontra o grupo heme da proteína com relação a coordenação de ligantes endógenos e exógenos e seus estados de oxidação.

Um conjunto de proteínas pertencente a classe das hemoproteínas e que tem sido tópico de poucos estudos nos últimos anos são as globinas extremófilas encontradas no genoma da bactéria *Methylococcus infernorum*. Essa bactéria é um metanótrofo aeróbico, ou seja, metaboliza metano como fonte de energia. Tal microorganismo pode ser encontrado em regiões geotermiais da Nova Zelândia e tem crescimento ótimo a 60 °C e em pH 2,0-2,5 [10]. As proteínas encontradas em organismos que vivem sob condições extremas apresentam características que têm sido exploradas em diversos estudos biotecnológicos, visando, por exemplo, melhoramentos de processos catalíticos [11]. Dentre as globinas hêmicas identificadas no *M. infernorum*, se encontra a HGbI (*Hell's Gate Globin I*), uma heme proteína

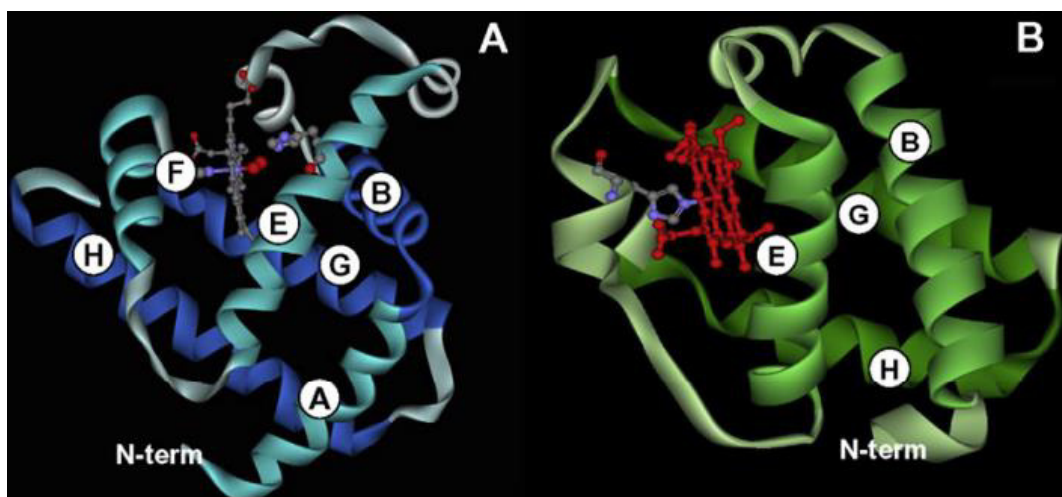
pertencente à família das globinas, termoestável e que apresenta uma estabilidade anômala em soluções de pH abaixo de 4.

### 1.1 HGbI (*Hells Gate Globin I*)

A família das globinas é classicamente composta por uma estrutura 3/3 de alfa hélices contendo 8 hélices classificadas de A a H e composta por aproximadamente 150 resíduos de aminoácido [12]. Essa estrutura 3/3 de alfa hélices da proteína é caracterizada pelo padrão de enovelamento [12] em que há a sobreposição das estruturas secundárias no entorno do grupo heme e as hélices F, G e H se encontram próximas a posição proximal, enquanto que as nomeadas A, B e E, encontram-se próximas a região distal, como ilustrado na Figura 4A.

Além do padrão 3/3 de alfa hélice, também foi identificado um outro grande grupo de globinas, as que apresentam o padrão 2/2 de alfa hélice [12]. Esse grupo de globinas, conhecidas por “truncadas”, apresenta uma redução de 20 a 40 aminoácidos em sua estrutura se comparadas às globinas padrão de enovelamento clássico. Essa redução ocasiona algumas modificações estruturais resultando, por exemplo, na redução ou ausência da hélice A e na presença de apenas as hélices BC, E, G e H no entorno do heme, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Comparação estrutural entre os padrões de enovelamento 3/3 (A) e 2/2 (B) na família das globinas.



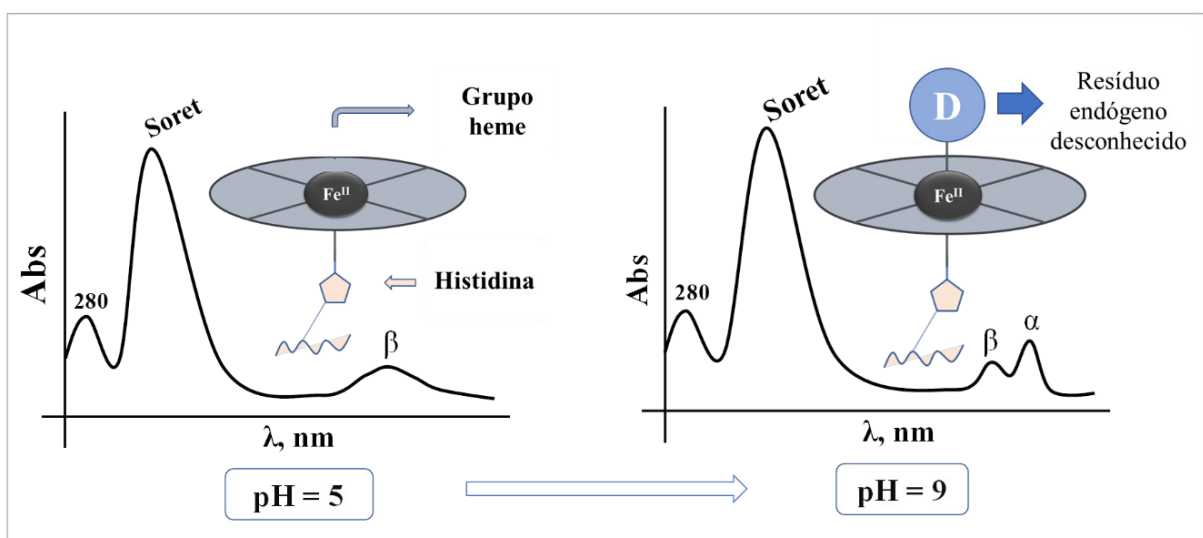
Fonte: adaptado de H. Wajcman et al. (2009) [12].

Além da HGbI, foram identificadas no genoma do *M. inferorum* outras quatro globinas: HGbII, HGbIII, e HGbRL com estrutura 3/3 de alfa hélices e HGbIV que apresenta uma estrutura 2/2 de alfa hélices. Além da HGbI, apenas as proteínas HGbRL e HGbIV [13–

15] foram estudadas até o momento. Apesar dos estudos de caracterização, afinidade por ligantes e de dinâmica molecular [16] realizados para HGbI [17], ainda perduram diversos questionamentos acerca de seu funcionamento, em especial no que se refere à sua função biológica no organismo de origem. Além disso, essa proteína apresenta características peculiares em relação a outras globinas que sugerem um comportamento incomum associado, provavelmente, ao par redox  $\text{Fe}^{\text{III/II}}$  do grupo heme.

Usualmente, proteínas globinas apresentam uma ligação Fe-His estável na posição proximal em condição de neutralidade [18]. Ao reduzir o pH do meio, porém, a um valor menor que 4,7, referente ao  $\text{pK}_a$  das cadeias imidazólicas, ocorre a quebra dessa ligação de modo que o grupo heme pode ser removido da proteína [19]. A proteína HGbI, diferente de outras globinas, apresentou um comportamento anômalo uma vez que mesmo em pH 2,8, o grupo heme se mantém estável [16]. Para além da estabilidade em meio ácido, essa proteína também apresenta propriedades estruturais distintas, sendo observado no estado reduzido um equilíbrio dependente do pH entre as formas penta e hexacoordenada, observado pela presença da banda  $\beta$  em menor intensidade em relação a  $\alpha$  em soluções de pH 8,6 e 7,0. A natureza do resíduo aminoácido envolvido nesse processo, todavia, ainda não foi elucidada [16], como ilustrado na Figura 5. No estado oxidado ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ , met-HGbl), mesmo com variações no pH do meio, a proteína permanece hexacoordenada [16].

Figura 5 - Perfis ilustrativos dos espectros eletrônicos da HGbI no estado reduzido ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ , desoxi-HGbl) em condição ácida (pH 5,0) e em condição básica (pH 9,0).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Outra característica interessante diz respeito à afinidade por ligantes, em especial  $O_2$ . A proteína HGbI apresentou umas das maiores afinidades por oxigênio já reportadas para globinas com  $K_d = 0,53 \times 10^{-9}$  (a 25 °C, pH 7), valor este que sugere que sua função no *M. infernorum* não é de transporte de oxigênio. Adicionalmente, esse baixo valor de constante de dissociação também descarta a possibilidade de a mesma atuar como sensor de  $O_2$  [16]. A proteína apresenta, ainda, uma acentuada afinidade pelo íon acetato, característica incomum em hemoproteínas. Na presença dessa espécie, parece ocorrer uma reação de oxidação induzida do íon  $Fe^{II}$  a  $Fe^{III}$ . Esses dados indicam a necessidade de se estudar o comportamento redox do grupo heme da proteína HGbI. A medida do valor do potencial do ponto médio ( $E_m$ ) [20] frente a diferentes condições pode fornecer informações relevantes e contribuir para o esclarecimento do comportamento redox dessa proteína.

## 1.2 Eletroquímica de Hemoproteínas

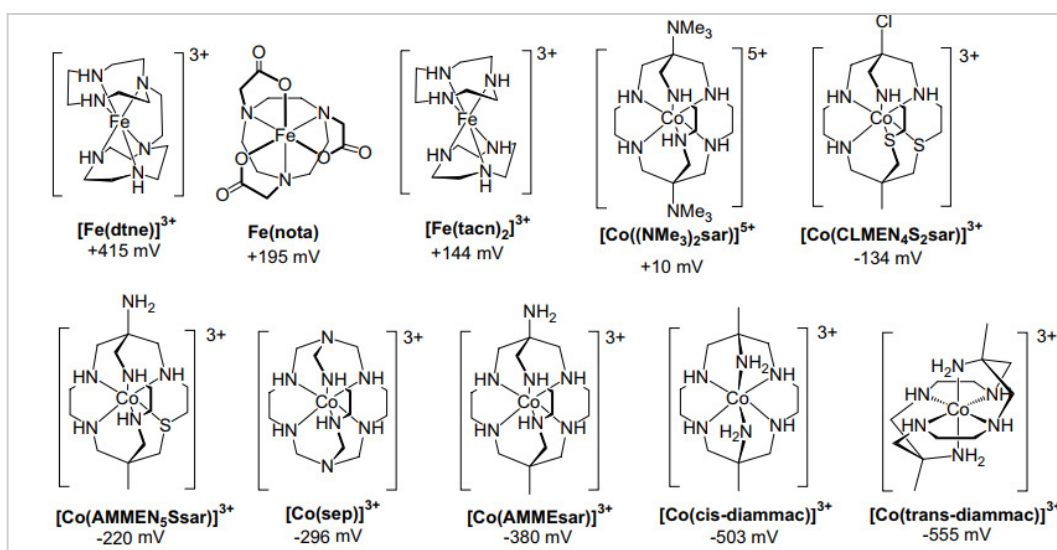
Estudos eletroquímicos podem fornecer informações acerca das propriedades termodinâmicas e estruturais de hemoproteínas sendo útil, portanto, para o esclarecimento de algumas características da proteína HGbI. A propriedade que se relaciona intrinsecamente com o par redox  $Fe^{III/II}$  contido no grupo heme é o potencial do ponto médio ( $E_m$ ), termo utilizado para se referir ao potencial redox quando se trata de sistemas biológicos [20]. Esse parâmetro termodinâmico corresponde à variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) necessária para promover a conversão entre os estados de oxidação do ferro da proteína. Por se tratar de um sistema complexo, entretanto, esse termo é resultado da contribuição de diversos parâmetros [21,22], como a energia resultante da interação com o centro redox, fatores conformacionais e interações eletrostáticas com resíduos polares entre o solvente e a proteína.

Por meio da medida do valor de  $E_m$ , foi possível esclarecer a função biológica de hemoproteínas sensoras, como a DevS [23], e de globinas tal como a proteína GLB-6 [24]. Adicionalmente, em um estudo realizado com a hemoproteína sensora FixL [25], pôde-se compreender melhor o papel das propriedades eletrônicas do grupo heme, ilustrando que o valor de  $E_m$  não depende apenas do ligante na posição distal, mas resulta de uma combinação entre fatores conformacionais e interações entre os grupos propionatos que podem ser dominantes. Para a determinação desse parâmetro termodinâmico, técnicas eletroquímicas convencionais podem ser inviáveis uma vez que as proteínas apresentam baixo coeficiente de difusão e, eventualmente, podem experimentar desnaturação ao se adsorverem na superfície de eletrodos metálicos [26], impossibilitando a realização das medidas. Uma estratégia utilizada para superar

essas dificuldades experimentais é a associação entre técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, denominada espectroeletroquímica. O uso da técnica não se limita ao estudo de proteínas redox, uma vez que qualquer espécie eletroativa pode ser estudada desde que apresente resposta a uma técnica espectroscópica, podendo ser espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis ou vibracional, por exemplo [27]. Em sistemas contendo hemoproteínas se utiliza, geralmente, a espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis. Isso ocorre devido a uma característica intrínseca desse tipo de sistema, conforme comentado anteriormente, que é a presença das bandas Soret e Q, resultantes de transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel porfirínico [5]. Essas bandas, por serem sensíveis ao estado de oxidação e/ou à presença de ligantes axiais coordenados ao ferro do grupo heme, podem ser utilizadas para acompanhar a transição entre os estados redox à medida que o potencial é aplicado.

Devido à baixa velocidade em que ocorre o transporte difusional de proteínas em solução, o contato entre o centro redox e a superfície do eletrodo é ineficiente. Utiliza-se, assim, compostos conhecidos como mediadores eletroquímicos que facilitam o fluxo eletrônico entre a proteína e a superfície metálica [28]. Nessa perspectiva, Bernhardt e colaboradores [29] sintetizaram complexos de cobalto e ferro, ilustrados na Figura 6, que se mostraram eficientes em atuar como mediadores em titulações potenciométricas envolvendo sistemas biológicos. Esses mediadores cobrem a faixa de potencial de +400 a -550 mV, necessária para determinar os valores de  $E_m$  das proteínas e, além disso, não apresentam variação de potencial em função do pH e nem bandas de absorção que possam interferir na região do visível.

Figura 6 - Complexos de ferro e cobalto que podem atuar como mediadores em titulação potenciométrica e de seus respectivos valores de potencial formal em mV.



Fonte: Bernhardt et al, 2006.

Para a determinação do valor de  $E_m$  em hemoproteínas pode-se utilizar a Equação 1, obtida da relação entre duas outras equações: a de Nernst e a Lei de Lambert-Beer [29]. Considerando um sistema de dois componentes em que ocorre a transferência de apenas um elétron de maneira reversível e em que não ocorrem reações químicas interferentes, a concentração das formas oxidada e reduzida será uma medida direta da absorbância da solução. Dessa forma, através desta relação, faz-se possível relacionar as duas equações e, através de um ajuste não linear, determinar o valor de  $E_m$  da proteína em diferentes condições [29].

$$\text{Abs} = \frac{A_{\text{ox}} \times 10^{n(E-E_m)} + A_{\text{red}}}{1 + 10^{\frac{n(E-E_m)}{59}}} \quad (1)$$

Em que:

Abs é a absorbância máxima no potencial aplicado;

$A_{\text{ox}}$  é a Absorbância máxima da proteína totalmente oxidada;

$A_{\text{red}}$  é a Absorbância máxima da proteína totalmente reduzida;

$n$  é o número de elétrons = 1;

$E$  é o potencial aplicado (mV);

$E_m$  é o potencial do ponto médio da proteína.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As hemeproteínas podem atuar como armazenadoras de oxigênio, sensoras de pequenas moléculas ou como participantes de reações redox necessárias para o funcionamento metabólico do organismo do qual fazem parte. O grupo heme está intrinsicamente relacionado às funções exercidas por essas proteínas, sendo o potencial do par redox  $\text{Fe}^{\text{III/II}}$  um parâmetro importante a ser determinado para a elucidação de características estruturais e para uma melhor compreensão dos processos que envolvem transferência eletrônica nesses sistemas. A proteína HGbI, uma proteína extremófila pertencente à família das globinas e identificada no genoma do *M. Infernourum*, ainda não teve sua função biológica determinada. Estudos biofísicos de afinidade e de dinâmica molecular [16] sugerem que essa proteína não atua como armazenadora ou sensora de  $\text{O}_2$ . Perduram, ainda, questionamentos em virtude da pouca quantidade de informações acerca das suas características, tais como afinidade anômala por acetato, estabilidade em meio ácido, termoestabilidade, além da capacidade incomum de modificar a coordenação do grupo heme em função do pH do meio. Esses comportamentos que, essencialmente, envolvem interações com o íon  $\text{Fe}^{\text{III/II}}$  presente no grupo heme, indicam que o comportamento redox dessa proteína deve ser estudado.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o comportamento redox da proteína HGbI por espectroeletróquímica na ausência e na presença de ligantes através da utilização de mediadores redox.

Especificamente, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Expressar em sistema heterólogo (*E. coli*, BL21(DE3)) a hemeproteína recombinante HGbI a partir do plasmídeo pET3a;
- Purificar e avaliar a pureza da proteína;
- Determinar os valores de potencial do ponto médio ( $E_m$ ) nas seguintes condições:
  - I. Ausência de ligantes em soluções de diferentes valores de pH (de 3,5 a 9,5);
  - II. Presença dos ligantes CO, imidazol,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{O}_2$  e acetato.



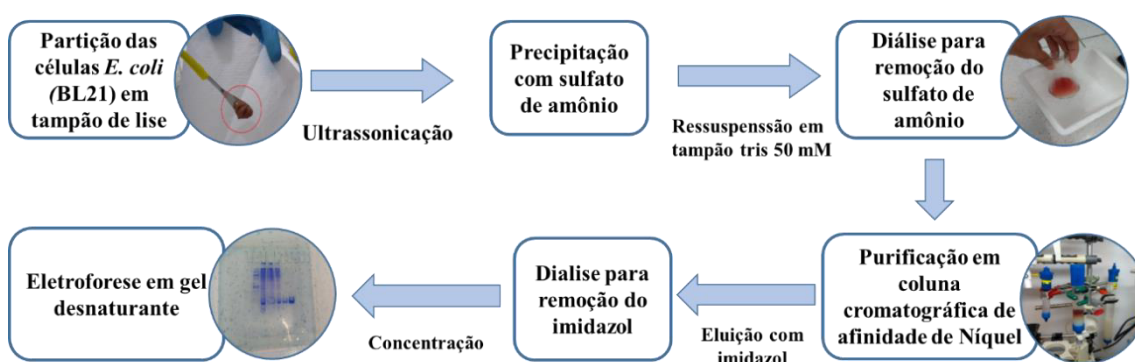
### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura apresentando resistividade maior que 18 MΩ cm. Todos os procedimentos na etapa de expressão da proteína recombinante que exigiam condição estéril foram realizados nas proximidades da chama de um bico de Bunsen e os materiais utilizados foram previamente autoclavados.

#### 3.1 Expressão e purificação da proteína HGbl

A proteína HGbl foi expressa conforme procedimento reportado na literatura [16]. O esquema ilustrado na Figura 7 apresenta as etapas de purificação a que foi submetida até a obtenção e verificação de sua forma pura.

Figura 7 - Etapas de purificação da proteína HGbl.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Para isolar a proteína HGbl expressa em *E. coli*, fez-se uso de procedimentos clássicos levando-se em consideração as propriedades intrínsecas das proteínas como carga, solubilidade, características estruturais e afinidade por metais, que permitissem separar e purificar o sistema de interesse de outros componentes presentes durante a expressão pelas células bacterianas [30].

##### 3.1.1 Partição das células

Após a obtenção das células, fez-se necessário obter a proteína de interesse que se encontrava expressa no citosol bacteriano da *E. coli* (BL21(DE3)). Para isso, foi utilizado um tampão de lise composto de tris-HCl, pH 8,0, (Sigma-aldrich), NaCl (Serva), KCl (Amresco), glicerol (Sigma-aldrich), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, Sigma-aldrich), 2-mercapetanol (Sigma-aldrich), PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*, Sigma-aldrich) e

lisozima (Sigma-aldrich) que catalisa uma reação que promove o rompimento da parede celular bacteriana. Após ressuspendida no tampão, transferiu-se a solução contendo as células para um recipiente a 10 °C onde foram submetidas a ultrassom por 40 minutos utilizando o sonicador de sonda Vibracell TM SONICS (U.S.A.); sendo 1 minuto de pulso e 1 minuto em repouso, sob agitação constante. Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a 14000 rpm em uma centrífuga 3-30K SIGMA® por 40 minutos. O *pellet* contendo fragmentos insolúveis foi descartado, enquanto o sobrenadante foi reservado para posterior precipitação com sulfato de amônio.

### **3.1.2 Precipitação com sulfato de amônio**

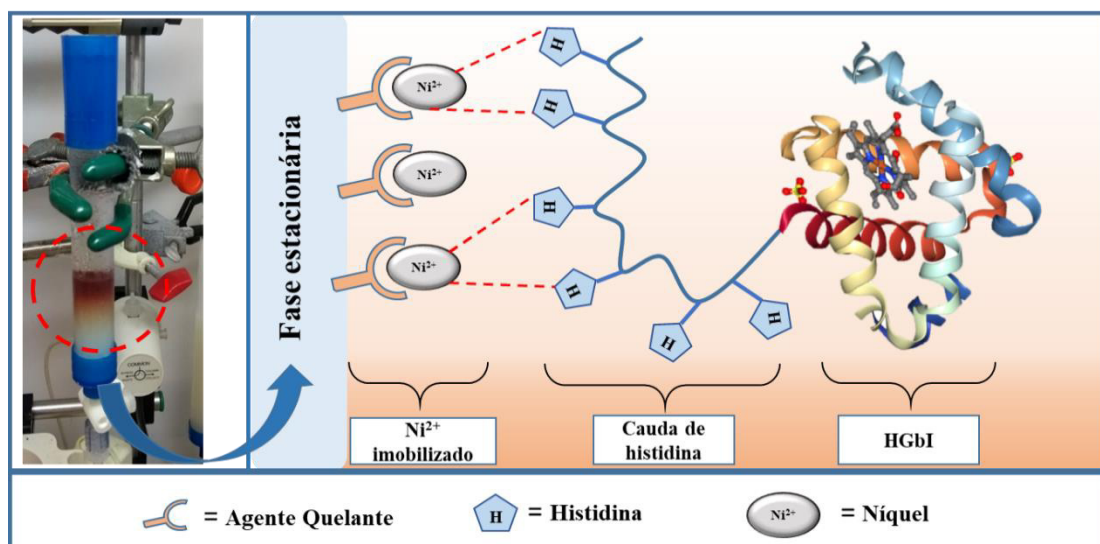
Nesta etapa, utilizou-se a diferença de solubilidade entre as proteínas para realizar uma primeira purificação da amostra. Apesar dessa propriedade ser uma função complexa que envolve pH, temperatura e concentração salina, tem-se observado que certas soluções de elevada concentração salina promovem a precipitação de proteína globulares [31], tornando-as insolúveis e permitindo a separação de componentes indesejáveis, sem desnaturá-las. Esse efeito é conhecido como *salting out* [30]. Adicionou-se uma solução saturada de sulfato de amônio à mistura até atingir o percentual de 60% quando, então, observou-se a formação de um precipitado avermelhado indicando a presença da proteína HgBI na fase insolúvel. A fração insolúvel da proteína foi ressuspendida em um tampão tris 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> e levada à diálise em tampão tris HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> em uma membrana com porosidade de 3500 Da para remoção de excesso de sulfato de amônio, tornando a amostra compatível para uso em coluna de afinidade por níquel.

### **3.1.3 Isolamento em coluna cromatográfica de afinidade**

Após expressão da proteína HgBI em sua forma *his-tagged*, ou seja, contendo uma cauda de 6x-histidina em sua porção C-terminal, a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, do inglês *immobilized metal affinity chromatography*). Nessa técnica, a coluna utilizada é composta por uma fase estacionária (geralmente, agarose ou sílica) em que um metal (Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup>) é imobilizado por meio da ação de um agente quelante que se liga à fase estacionária, mas que mantém um ou dois sítios de coordenação livres e acessíveis para interação com a proteína [32,33]. O processo de purificação ocorre através da coordenação da região da proteína que contém histidinas

sequenciais ao íon metálico [34]. A Figura 8 ilustra um esquema representativo do funcionamento da IMAC carregada com íons  $\text{Ni}^{2+}$  que interagem com uma proteína *his-tagged*.

Figura 8 - Esquema ilustrativo (fora de escala) da técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Neste trabalho, utilizou-se uma coluna cromatográfica de afinidade de níquel (Sigma-Aldrich). Após a primeira diálise para remoção do excesso de sulfato de amônio, a solução obtida foi levada à coluna previamente equilibrada com tampão Tris 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0. Ao iniciar a purificação, acoplou-se a coluna ao equipamento FPLC (do inglês *fast protein liquid chromatography*) (Biorad) para o acompanhamento das etapas de lavagem e eluição por absorção eletrônica em 280 nm, referente [35] às transições eletrônicas dos resíduos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina que, conjuntamente, correspondem à medição da concentração total de proteínas. Na primeira lavagem da coluna, adicionou-se 30 mL de tampão Tris 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0. Em seguida, foram adicionados, respectivamente, volumes iguais de soluções 50 e 70 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. Ao adicionar a solução 100 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, observou-se um espalhamento expressivo da banda na coluna referente à HgbI, claramente visualizada pela sua cor vermelha, ilustrada na Figura 8 (círculo vermelho tracejado no lado esquerdo). Para garantir uma eluição completa, aplicou-se uma solução 125 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. Após essa adição, passou-se a coletar a proteína que foi novamente dialisada para remoção do imidazol excedente em 1 L de tampão tris HCL 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> por 1 h e em 3 L por 12 h. Em cada etapa de

purificação da proteína HgBI, foram coletadas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  para posterior aplicação em um gel desnaturante de poliacrilamida com corrida eletroforética.

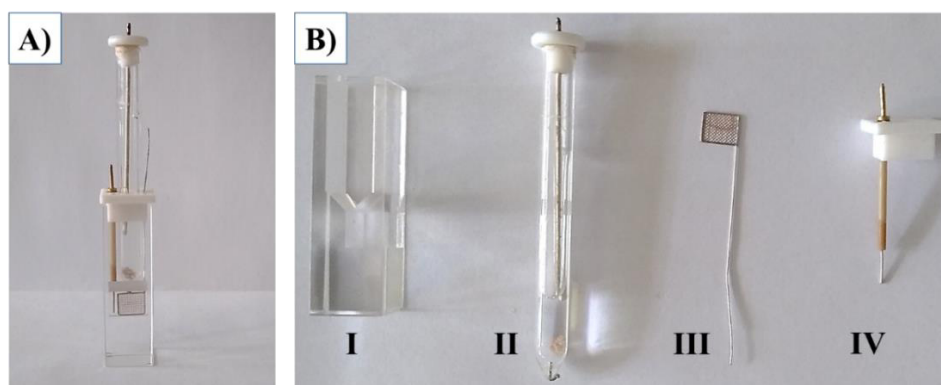
### 3.1.4 Eletroforese em gel

A fim de avaliar a pureza da proteína HgBI, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Para que a corrida em gel fosse realizada, as frações coletadas durante a purificação da proteína tiveram de ser submetidas a uma etapa de preparação em que foram deliberadamente desnaturadas pela adição de tampão de duodecil sulfato de sódio (SDS) ( $0,125 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS;  $700 \text{ mmol L}^{-1}$  2-mercaptoetanol; 10% glicerol e  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  azul de bromofenol) e aquecimento a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Como marcador molecular foi utilizado o *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards* (#1610363, Bio-rad) que contém 10 proteínas com massa molecular entre 10 e 250 kDa. As amostras foram aplicadas no gel 15% (PAGE-SDS) e, então, submetidas a uma diferença de potencial de 150 V. Após 50 minutos, com a finalização da corrida eletroforética, procedeu-se a revelação do gel usando solução de azul de *Coomassie* 5g/L (Sigma-Aldrich) contendo ácido acético glacial 7,5% (Vetec) e metanol 45% (Vetec), sob agitação. Em seguida, descoloriu-se o gel em solução composta por 45% metanol (v/v) e 7,5% ácido acético glacial (v/v). As imagens dos géis foram registradas utilizando-se um fotodocumentador Gel Doc EQ System w/ Universal Hood II (Bio-rad).

## 3.2 Espectroeletróquímica

A determinação do valor de  $E_m$  da proteína HgBI foi realizada por meio de titulação espectroeletróquímica consistindo na associação entre as técnicas de eletrólise a potencial controlado e espectroscopia de absorção eletrônica nas regiões do UV-Vis. Enquanto o potencial é aplicado em um intervalo que promove a conversão da proteína em seus estados redox, o espectro eletrônico é coletado. A partir dos dados obtidos, tem-se informações como o valor de  $E_m$ , além da possibilidade de determinar parâmetros termodinâmicos como  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$  [36]. Nesse trabalho, utilizou-se como célula espectroeletróquímica uma cubeta OTTLE (do inglês *optically transparent thin-layer*) de caminho óptico 0,1 cm, apresentada na Figura 9. O sistema é composto por eletrodo de trabalho, uma malha fina de platina que permite a passagem do feixe de luz, um eletrodo auxiliar, também de platina e, por fim, um eletrodo de referência  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$ , 196 mV vs eletrodo padrão de hidrogênio (EPH).

Figura 9 - Célula espectroeletróquímica OTTLE utilizada nos experimentos. A) Célula espectroeletróquímica montada. B) I. Cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm; II. Eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl<sub>(sat)</sub> (196 mV vs EPH); III. Eletrodo de trabalho composto por uma malha fina de platina; IV. Contra eletrodo de platina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A célula espectroeletróquímica foi acoplada ao Potenciostato 910 PSTAT mini (Metrohm Autolab) e a um espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent, Austrália). Nos sistemas em que foi necessária condição anaeróbica, as soluções utilizadas foram previamente desaeradas, bem como a adição do tampão, proteína e mediadores à cubeta foi realizada em uma câmara anaeróbica (COY laboratory). Durante a realização do experimento, a cubeta foi acoplada a um fluxo constante de argônio para garantir uma atmosfera inerte e impedir seu contato com oxigênio.

Os experimentos foram realizados na presença de mediadores eletroquímicos que cobrissem a faixa de potencial esperada para obtenção da proteína em suas formas totalmente oxidada e reduzida.

A Tabela I apresenta os compostos utilizados que, de A a F, foram cedidos pelo professor Paul Bernhardt (University of Queensland, Austrália) e cujas sínteses encontram-se reportadas na literatura [29]. Os compostos G e H foram obtidos comercialmente (procedência da Sigma-Aldrich). A Tabela 1 apresenta, também, os valores de potenciais de meia-onda ( $E_{1/2}$ ), os quais foram determinados por voltametria cíclica usando-se a Equação 2:

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2)$$

Em que  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  são, respectivamente, os potenciais de pico anódico e catódico.

Tabela 1 - Valores de  $E_{1/2}$  dos compostos utilizados como mediadores redox nas titulações espectroeletroquímicas.

Item	Mediadores	$E_{1/2}$ vs EPH (mv)
A)	[Co( <i>trans</i> -diammac)]Cl <sub>3</sub>	-555
B)	[Co(AMMEsar)]Cl <sub>3</sub>	-380
C)	[Co(AMME-N <sub>5</sub> S-sar)]Cl <sub>3</sub>	-220
D)	[Co(CLMEN <sub>4</sub> S <sub>2</sub> sar)]Cl <sub>3</sub>	-134
E)	[Co(NMe <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> sar]Cl <sub>5</sub>	10
F)	Fe(NOTA)	195
G)	Ferrocenometanol	447
H)	[Ru(CN) <sub>6</sub> ]Cl <sub>4</sub>	657

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Nesse trabalho, analisou-se como o potencial do ponto médio ( $E_m$ ) da proteína HGbI se comporta frente a duas condições experimentais. Na primeira, foram determinados os valores de  $E_m$  da proteína HGbI (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos ligantes O<sub>2</sub>, CO, imidazol e CN<sup>-</sup> (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições experimentais para determinação dos valores de  $E_m$  da proteína HGbI.

Condição experimental	Tampão	Mediadores	pH
Sem ligantes		A a F	8,0
CO (solução saturada através de borbulhamento)	Tampão Tris 50 mmol L <sup>-1</sup>	A a G	8,0
Imidazol, 50 mmol L <sup>-1</sup>	e NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>	A a F	8,0
O <sub>2</sub> (meio aeróbico)		A a F	8,0
CN <sup>-</sup> , 4 mmol L <sup>-1</sup>		A a F	9,5
Acetato, 10 mmol L <sup>-1</sup>		A a F	8,0 e 5,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na segunda condição experimental, avaliou-se a influência do pH do meio no valor de  $E_m$  da proteína. Para isso, realizaram-se titulações espectroeletroquímicas de soluções 30

$\mu\text{mol L}^{-1}$  de HGbI na faixa de pH de 3,5 a 9,5 na ausência de ligantes. A Tabela 3 apresenta, de maneira detalhada, as composições das soluções que foram utilizadas.

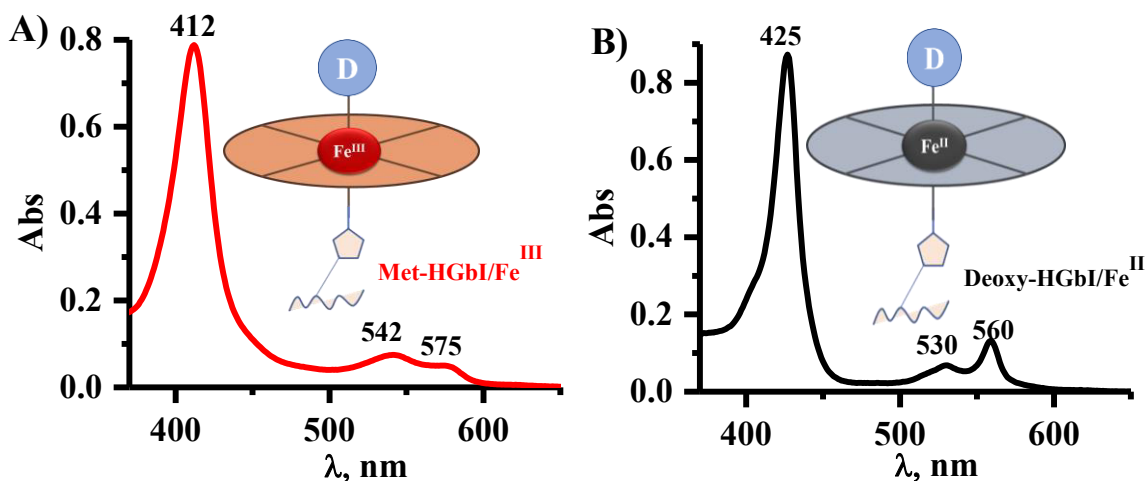
Tabela 3 - Condições experimentais para determinação dos valores de  $E_m$  da proteína HGbI na ausência de ligantes.

<b>pH</b>	<b>Tampão</b>	<b>Mediadores</b>
3,5	PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>	
6,0	PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>	
7,0		
8,0		A a F
9,0	Tris 50 mmol L <sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>	
9,5		

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Após a montagem do sistema descrito acima, utilizou-se o seguinte procedimento para determinação dos valores de  $E_m$ : todas as titulações foram iniciadas com aplicação, por cerca de 15 minutos, de um potencial tal que a proteína se encontrasse em um estado de oxidação específico e não fossem observadas alterações no espectro eletrônico. Para garantir que a condição foi atingida, o espectro eletrônico era comparado aos espectros das formas oxidada (met-HGbI) e reduzida (desoxi-HGbI), ilustrados na Figura 10.

Figura 10 - Perfil espectroscópico da proteína HGBI ( $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão pH 8 tris  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  / NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  nas formas oxidada e reduzida. A) Espectros eletrônicos de absorção nas regiões do UV-Vis das formas oxidada (A) e reduzida (B) da proteína HGBI após oxidação e redução química utilizando hexacianoferrato(III) e ditionito de sódio, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

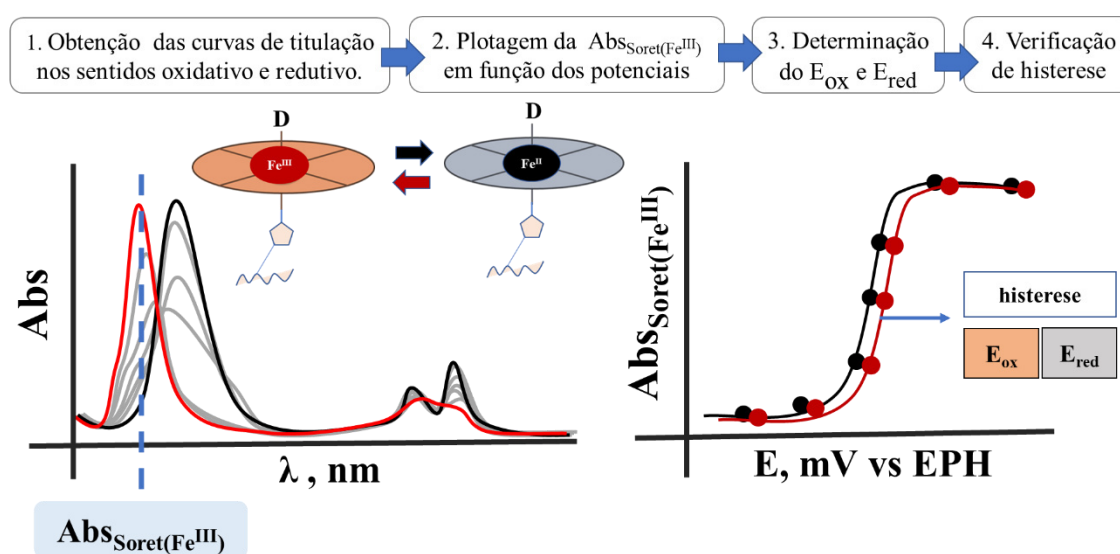
Para obtenção dos espectros apresentados na Figura 10, realizou-se, previamente, os procedimentos de oxidação e redução química. No primeiro, uma solução  $7 \mu\text{mol L}^{-1}$  da proteína HGBI em tampão Tris  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  / NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  foi adicionada a uma cubeta contendo o agente oxidante hexacianoferrato(III) em concentração cinco vezes superior. O espectro da forma oxidada ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) foi obtido após 20 minutos (Figura 10A). Na redução química, o procedimento foi realizado em uma câmara anaeróbica (COY laboratory) para impedir a ligação da forma reduzida da proteína ao oxigênio. Inicialmente, um tampão Tris  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  / NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  foi desaerado e, em seguida, foi adicionado juntamente com uma solução  $7 \mu\text{mol L}^{-1}$  da proteína HGBI à uma cubeta. Como agente redutor, utilizou-se ditionito de sódio em concentração cinco vezes superior ao da proteína. Após a adição do ditionito, aguardou-se 20 minutos e foi observado o espectro da proteína em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), ilustrado na Figura 10B.

Posteriormente, foram aplicados potenciais no sentido oxidativo/redutivo com variações de 100 e 50 mV com o intuito de promover a conversão da proteína entre os estados de oxidação. Em cada potencial aplicado, aguardou-se cerca de 10 minutos para que o sistema alcançasse o equilíbrio aparente, indicado por valores constantes de absorbância. Ao observar mudanças significativas na absorbância entre dois valores de potencial, variações de 25 mV foram aplicadas até ser observado que a proteína se apresentava em um único estado de



oxidação, o que foi verificado através das bandas Soret e Q. Ao atingir um determinado estado de oxidação, realizou-se novamente a titulação potenciométrica, porém, no sentido inverso para analisar a presença de histerese e a reversibilidade do sistema. As medidas foram realizadas utilizando um eletrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$  e, posteriormente, foram convertidas para valores de referência em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio ( $\text{Ag}/\text{AgCl} = 196 \text{ mV vs EPH}$ ). Para cada experimento realizado, foram obtidas curvas espectroscópicas em função dos potenciais aplicados. Com auxílio de um programa gráfico, para cada uma das titulações realizadas, plotou-se os valores de absorvância da banda Soret para a forma oxidada em função dos valores de potencial aplicado para as titulações oxidativa e redutiva. Dessa forma, foi possível obter duas curvas de perfil sigmoidal, por meio das quais pode-se calcular os valores de potencial de oxidação ( $E_{\text{ox}}$ ), para a titulação oxidativa e os valores de potencial de redução ( $E_{\text{red}}$ ) para a titulação redutiva e além disso, foi possível verificar a presença de histerese. O procedimento e as etapas de tratamento dos dados se encontram ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Etapas realizadas para obtenção e tratamento dos dados referentes as titulações espectroeletroquímicas realizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Além da determinação dos valores de  $E_{\text{ox}}$  e  $E_{\text{red}}$ , realizou-se um tratamento dos dados espectrais obtidos em função dos potenciais aplicados e calculou-se o valor de  $E_m$  utilizando o programa *ReactLab Redox* [37] por meio de um ajuste não linear global aplicando-se a Equação 1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação da Hell's Gate Globin I

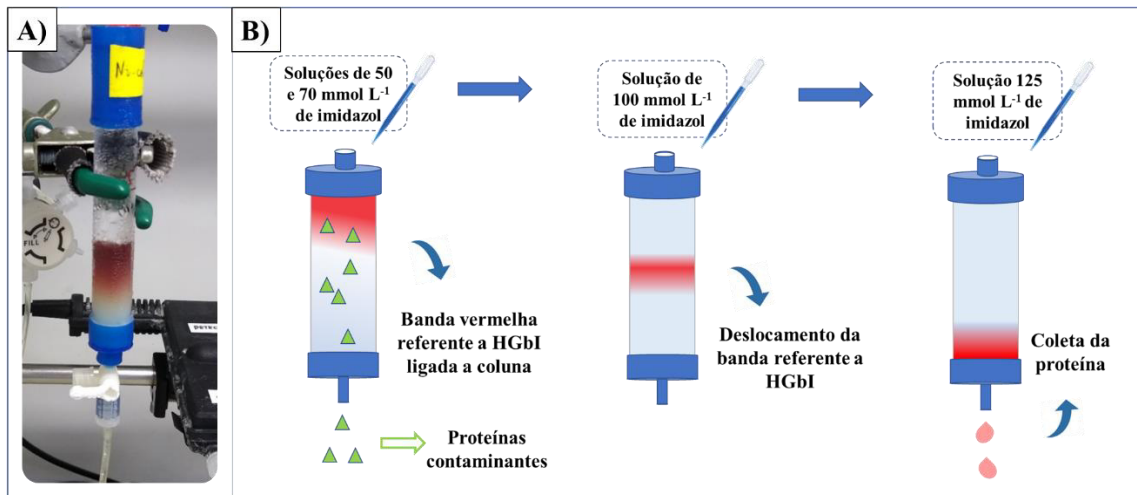
A proteína HGbI foi expressa em sua forma *his-tagged*, em que uma cauda de seis resíduos de histidina sequenciais se apresenta ligada à extremidade C-terminal. Esses resíduos não nativos facilitam o processo de purificação, uma vez que conferem à proteína afinidade por cátions como  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  presentes na forma de complexos metálicos ancorados nas colunas de afinidade cromatográfica [38]. Previamente, foi confirmado que a presença dessa cauda não interfere nas propriedades da proteína HGbI, não havendo motivação para sua remoção após purificação [16].

Nesse tipo de coluna de afinidade, a eluição da proteína pode ocorrer de dois modos. No primeiro, pode-se reduzir o pH do meio com a adição de uma solução tampão ácida promovendo, desta forma, a protonação dos átomos de nitrogênio presentes nas histidinas ( $\text{pK}_a = 6$ ) e, por consequência, competindo e rompendo a ligação formada entre o resíduo de aminoácido que se coordena ao metal presente na coluna. O outro modo, mais comum e que foi utilizado neste trabalho, consiste em adicionar à coluna soluções de imidazol em concentrações crescentes. Por possuir afinidade pelo íon  $\text{Ni}^{2+}$  tanto quanto a cauda de histidina (na verdade o resíduo lateral da histidina é um grupo imidazol), o imidazol compete pelo sítio de ligação. Assim, ao se atingir uma determinada concentração, tem-se a eluição da proteína que se desliga do metal da resina e fica livre em solução [38].

Anteriormente à aplicação da amostra em coluna de afinidade realizou-se uma etapa de purificação por precipitação com sulfato de amônio. Logo em seguida, a fração proteica resolubilizada e dialisada foi adicionada à coluna de afinidade cromatográfica de  $\text{Ni}^{2+}$ , ilustrado Figura 12A, e foi realizado o acompanhamento espectroscópico (banda em 280 nm) usando o equipamento cromatográfico do tipo FPLC, após as adições de soluções 50,70, 100 e 125  $\text{mmol L}^{-1}$  de imidazol até a eluição da proteína. O procedimento de lavagem se encontra ilustrado na Figura 12B. Após a lavagem com soluções 50 e 70  $\text{mmol L}^{-1}$  de imidazol, observou-se variações na absorvância referentes a outras proteínas que se ligaram fracamente ao metal da resina e que foram eluídas sendo, por conseguinte, descartadas. Ao adicionar a solução 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de imidazol, como esperado, observou-se o deslocamento e espalhamento da banda vermelha referente à proteína HGbI na coluna, uma vez que o imidazol passou a competir mais fortemente pelos sítios de ligação do metal promovendo a liberação da mesma. Logo em

seguida, adicionou-se a solução 125 mmol L<sup>-1</sup> de modo a garantir a completa eluição da proteína HGbI.

Figura 12 - Purificação da proteína HGbI em coluna de afinidade de íons Ni<sup>2+</sup>. A) Coluna de níquel carregada com a proteína HGbI. B) Esquema ilustrativo da eluição da proteína na coluna (fração vermelha) após a adição de soluções 50, 70, 100 e 125 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol.



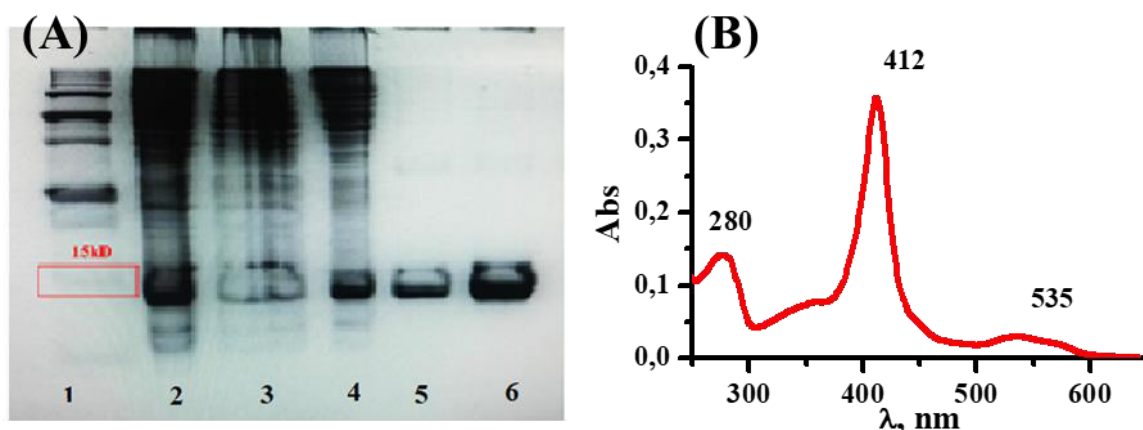
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A checagem da pureza das amostras eluídas e a eficiência das etapas de purificação foi realizada por análise em gel de poliacrilamida desnaturante e espectroscopia UV-Vis (Figura 13). As imagens dos géis de eletroforese encontram-se ilustradas na Figura 13A.

O poço 2 apresenta a fração citosólica após o rompimento das células no tampão de lise em que a grande quantidade de bandas se deve à presença de contaminantes proteicos diversos, dentre eles, outras proteínas da *E. coli* obtidas durante o processo de expressão da HGbI. Ao realizar a precipitação com sulfato de amônio, poços 3 e 4 (após diálise), pode-se observar uma leve diminuição no número de bandas, correspondente ao desaparecimento de algumas proteínas contaminantes que permaneceram solúveis durante o procedimento. O poço 5, pertencente a fração da proteína após a passagem pela coluna de afinidade cromatográfica de Ni<sup>2+</sup>, apresentou uma banda correspondente ao marcador molecular de 15 kD, valor próximo a massa molecular da HGbI sugerindo que o processo de purificação foi eficiente. No poço 6 é apresentado a fração correspondente à passagem pela coluna após a diálise para remoção do imidazol proveniente da etapa de purificação anterior, consistente com uma amostra de elevada pureza.

O espectro eletrônico obtido da fração final da proteína HGbI, Figura 13B, apresentou uma banda em 280 nm referente a concentração total de proteínas, uma Soret em 412 nm e uma banda  $\beta$  em 535 nm com um pequeno ombro a direita, associadas às transições eletrônicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  referentes ao anel porfirínico [5]. Essas observações evidenciam que, ao fim da purificação, a proteína se encontrava em sua forma  $\text{Fe}^{\text{III}}$  hexacoordenada (vide Figura 3). O espectro sugere, ainda, um estado de baixo spin, uma vez que não se observa uma banda de transferência de carga em 624 nm [39].

Figura 13 – Perfil de purificação da proteína HGbI. A) Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo as etapas de purificação da proteína. Poços: 1- Marcador molecular utilizado como padrão; 2- Fração solúvel (citosol); 3- Precipitação com sulfato de amônio. 4- Primeira diálise após precipitação com sulfato de amônio. 5- Fração eluída da coluna de afinidade de Níquel. 6- Segunda diálise após coluna de níquel. B) Espectro eletrônico obtido a partir de uma fração da proteína coletada ao fim da purificação em Tris 50 mmol L<sup>-1</sup> / NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O perfil espectroscópico da forma met-HGbI ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) se assemelha ao perfil observado para outras globinas hexacoordenadas com resíduos de aminoácidos na posição distal, como Kgb [9], Cgb [40], GLB-6 [24] e outras globinas também expressas pelo microrganismo *M. infernorum*, como as proteínas HGbIV [14] e HGbRL [15]. Adicionalmente, o espectro eletrônico de hemoproteínas pode ser usado como técnica adicional de validação de pureza, considerando que proteínas totais absorvem em 280 nm, como comentado anteriormente. A razão entre os valores de absorvância da banda atribuída às proteínas totais e da banda Soret ( $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{\text{Soret}}$ ) está associada ao grau de pureza de hemoproteínas [35], de maneira que quanto menor for o valor desta razão maior será a pureza da proteína. Para a

proteína HGbI, obteve-se um valor de 0,39 para a razão  $Abs_{280nm}/Abs_{Soret}$  sendo consistente com um elevado grau de pureza obtido para outras hemeproteínas [23,41]. Cabe ressaltar que estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) realizados com esta proteína nas mesmas condições experimentais confirmam a pureza.

## 4.2 Influência dos ligantes no valor de $E_m$

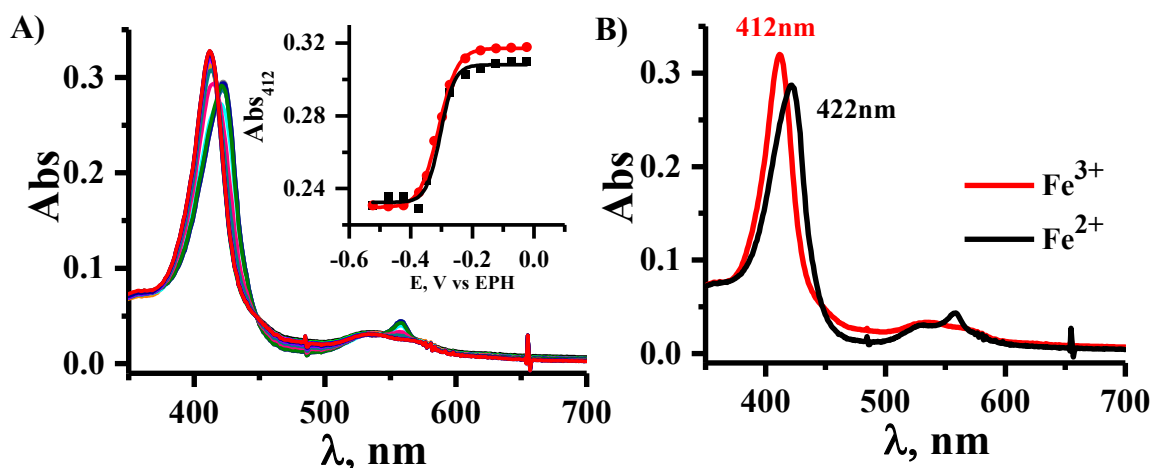
Para todos os sistemas estudados, aplicou-se um potencial inicial mínimo de +100 mV por 15 minutos até a obtenção de um espectro atribuído à proteína na forma oxidada [35] similar ao apresentado na Figura 10A. A partir desse ponto, os potenciais foram aplicados no sentido redutivo até um valor máximo de -600 mV. As curvas obtidas permitiram estimar o valor de  $E_m$  para cada condição experimental (presença ou ausência de ligantes e variação de pH). As curvas apresentadas na discussão a seguir tiveram seus valores de potencial aplicados em uma faixa de aproximadamente 300 mV (negativo e positivo) em relação ao valor de  $E_m$  previamente estimado.

### 4.2.1 *Desoxi-HGbI*

Para realização da titulação espectroeletróquímica na ausência de ligantes, todas as soluções utilizadas foram desaeradas em uma câmara anaeróbica. Além disso, foi mantido um fluxo constante de argônio na cubeta em que se realizou o experimento de modo a garantir que não ocorresse a ligação de oxigênio com a forma reduzida da proteína.

O potencial foi variado de -23 a -523 mV vs EPH em intervalos de 50 e 25 mV, sendo aplicada a segunda variação quando se observaram mudanças significativas nos valores de absorvância. O experimento foi iniciado com aplicação de potencial em -23 mV durante 15 minutos até obtenção de um perfil espectral correspondente à forma oxidada. Conforme o potencial era aplicado no sentido redutivo, observou-se o deslocamento da banda de 412 nm para 422 nm e o surgimento de duas bandas,  $\beta$  e  $\alpha$ , em 530 e 559 nm, respectivamente, mostrado na Figura 14. A banda  $\alpha$  apresentou maior intensidade em relação a  $\beta$  indicando a forma hexacoordenada da proteína, consistente com a forma desoxi-HGbI descrita na literatura [16].

Figura 14 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGBI na ausência de ligantes. A) Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A à F ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGBI (vermelho) e desoxi-HGBI (preto).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na forma hexacoordenada, o sexto ligante se trata, possivelmente, de um resíduo de aminoácido endógeno ainda não identificado. A mudança de perfil evidencia que a proteína passou da forma oxidada à reduzida, uma vez que os espectros nas formas met (Fe<sup>III</sup>) e desoxi (Fe<sup>II</sup>), respectivamente, são similares aqueles já reportados na literatura para a proteína HGBI [16]. Após a obtenção da forma reduzida, com o intuito de verificar a reversibilidade do sistema, o potencial foi varrido no sentido oxidativo nos mesmos intervalos aplicados. Não foi observado histerese (vide gráfico inserido na Figura 13A), sendo os valores dos potenciais de oxidação ( $E_{ox}$ ) e redução ( $E_{red}$ ) similares, o que sugere que apenas as formas Fe<sup>III</sup> e Fe<sup>II</sup> da proteína sem ligantes estão presentes no sistema estudado. A Tabela 4 apresenta as equações químicas sugeridas para as etapas oxidativa e redutiva da titulação espectroeletróquímica na ausência de ligantes exógenos.

Tabela 4 – Equações químicas sugeridas para a titulação espectroeletróquímica na ausência de ligantes exógenos nos sentidos oxidativo e redutivo.

Condição experimental	Etapa redutiva	Etapa oxidativa
Ausência de ligantes exógenos	$\text{Fe(III)} + e^- \rightarrow \text{Fe(II)}$	$\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)} + e^-$

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Por meio de um ajuste não linear utilizando a Equação 1, o valor de  $E_m$  foi calculado em  $-307 \text{ mV vs EPH}$ . Comparativamente a outras proteínas globinas hexacoordenadas que possuem duas histidinas ligadas nas posições proximal e distal (His-Fe-His) do grupo heme [24], o valor de  $E_m$  determinado para a proteína HGBI é consideravelmente mais negativo. A Tabela 5 apresenta valores de  $E_m$  para algumas proteínas hexacoordenadas para fins de correlação.

Dewilde e colaboradores [42] determinaram por meio de titulação potenciométrica o valor de  $E_m$  em  $-129 \text{ mV}$  para a proteína neuroglobina. Essa proteína, em termos estruturais, é a mais similar a HGBI, diferenciando-se por possuir uma hélice D e por apresentar uma His(E7) na posição distal, enquanto que a HGBI apresenta Gln50(E7) [16]. O valor de  $E_m$  da proteína neuroglobina também apresenta valor negativo, embora cerca de  $200 \text{ mV}$  mais positivo que aquele determinado para a proteína em estudo. Comparativamente à proteína HGBI, os diferentes valores de potencial determinados para proteínas com grupos heme bis-histidínicos sugerem a ausência de um resíduo histidina na posição distal, sendo consistente com a distância entre esses resíduos [16].

Tabela 5 - Valores de potencial do ponto médio ( $E_m$ ) para proteínas hexacoordenadas

Hemeproteína	Ligação axial	$E_m$ (mV) vs EPH	Referência
<b>Heme tipo b</b>			
HGbI	Desconhecido/His	-307	Este trabalho
NGb	His/His	-129	[42]
GLB-6	His/His	-196	[24]
Cgb	His/His	20	[40]
Mb H64V/V68H	His/His	-128	[43]
Mb	(H <sub>2</sub> O)/His	54	[43]
GbX	His/His	-119	[44]
THB1	Lys/His	-67	[45]
THB2	Lys/His	-90	[45]
THB4	Lys/His	-98	[45]
CDH	Met/His	164	[46]
All4978	(Cys-His)/His	-449	[47]
<b>Heme tipo c</b>			
Cyt c-551	Met/His	260	[48]
GSU0582	(H <sub>2</sub> O)/His	-156	[49]
GSU0935	Met/His	-251	[49]
Horseradish peroxidase	/His	-306	[50]

Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Jonhson e colaboradores [45] determinaram para as hemeproteínas THB1, THB2 e THB4, que apresentam o ligante endógeno lisina na posição distal, os valores de  $E_m$  de -67, -90 e -98 mV, respectivamente. Os valores, apesar de negativos, são bem distintos daquele determinado para a proteína HGbI. A possibilidade de coordenação com o resíduo Lys53(E10), por sua vez, não pode ser descartada. Para que essa ligação ocorra, entretanto, seriam necessárias mudanças conformacionais consideráveis [16]. Algumas hemeproteínas reportadas na literatura apresentam valor de potencial do ponto médio próximo ao determinado para a proteína HGbI, como é o caso da HRP ( $E_m = -306$  mV). Diferentemente da proteína HGbI, todavia, a proteína HRP apresenta um grupo heme do tipo c pentacoordenado. Para essa espécie, o valor negativo de potencial foi atribuído a efeitos entrópicos resultantes da interação do centro



metálico com moléculas de água na forma reduzida [50]. Para a proteína HGbI, os parâmetros termodinâmicos de entropia e entalpia não são conhecidos o que impede a avaliação do efeito destes sobre o valor de  $E_m$  neste trabalho.

Roncel e colaboradores, determinaram o valor de  $E_m$  para a proteína citocromo c550 e obtiveram o valor de -250 mV, cerca de 60 mV menos negativo que aquele determinado para HGbI. O valor de -250 mV foi atribuído a um equilíbrio ácido-base envolvendo o resíduo de tirosina na região distal do grupo heme que, na forma reduzida, encontra-se protonado em pH 9,5 [51]. Para a proteína HGbI no estado reduzido, não se pode descartar a influência do equilíbrio ácido-base de resíduos endógenos. Assim como comentado para o resíduo histidina, porém, não há resíduo tirosina próximo o suficiente para se coordenar ao átomo de ferro do grupo heme [16].

O valor de  $E_m$  negativo sugere, ainda, que a função da proteína HGbI no microrganismo de origem deve estar relacionada a uma química redox. A hexacoordenação pode colaborar para manter o potencial do sistema em valores negativos. Essa conclusão é relevante se for considerado que o papel fisiológico da proteína HGbI está envolvido em processos de transferência de elétrons, incluindo catálise de reações de redução [24].

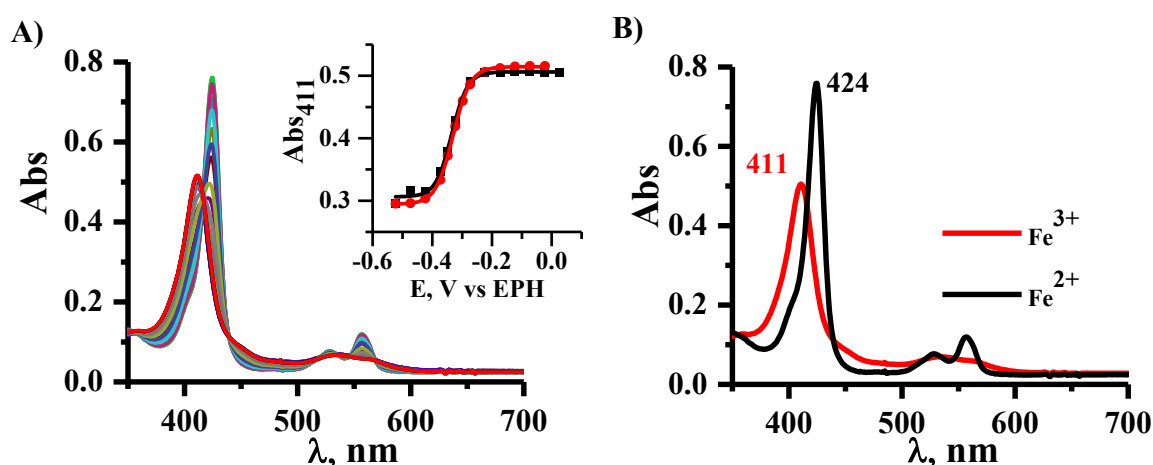
#### 4.2.2 *Imz-HGbI*

Geralmente, em hemeproteínas, o ligante imidazol se coordena ao íon ferro no estado oxidado ( $Fe^{III}$ ) apresentando, inclusive, amplas faixas de constantes de dissociação ( $K_d$   $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) [15,23,25,52]. A coordenação dessa molécula ao estado reduzido ( $Fe^{II}$ ), entretanto, pode ocorrer, como já reportado para a proteína DevS, apesar de apresentar baixa afinidade [23]. Esse resultado, todavia, não é frequentemente observado, sendo considerado um comportamento incomum.

Com o objetivo de verificar a influência do ligante imidazol no valor de  $E_m$  da proteína HGbI, foi realizada uma titulação espectroeletródica em condição anaeróbica em solução tampão contendo os mediadores de A à F (ver Tabela 1). As curvas obtidas experimentalmente e calculadas encontram-se ilustradas na Figura 15. Inicialmente, foi aplicado o potencial de +27 mV de modo a garantir a completa oxidação da proteína, condição que promoveria a possível coordenação do ligante imidazol. Após 15 minutos, observou-se valores constantes de absorvância e foi obtido um espectro eletrônico, apresentado na Figura 15B (curva vermelha). Nessa curva observa-se, além da banda Soret em 411 nm, a banda  $\beta$  em

565 nm com um ombro a direita. Curiosamente, o perfil observado se apresentou similar àquele obtido durante a titulação na ausência de ligantes exógenos. Essa observação sugere que não há ligação entre a proteína e o ligante no estado desoxi. Logo após garantir que a proteína HGbI estava em sua forma oxidada e não apresentava variações espectrais, aplicou-se potenciais no sentido negativo até -523 mV com intervalos de 50 e 25 mV. À medida em que ocorria a redução da proteína, constatou-se o desaparecimento da banda em 411 nm e o surgimento da banda em 424 nm, além do surgimento de duas outras bandas Q em 535 e 565 nm. Esse comportamento indica a obtenção da proteína em seu estado desoxi e hexacoordenada com um resíduo de aminoácido, tal como observado previamente na ausência de ligantes exógenos (Figura 14). Após a obtenção da forma reduzida, o potencial foi aplicado no sentido oposto até + 27 mV, utilizando os mesmos intervalos, e constatou-se a reversibilidade do processo.

Figura 15 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na presença de imidazol. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A à F ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e imidazol ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 411 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas imz-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho).

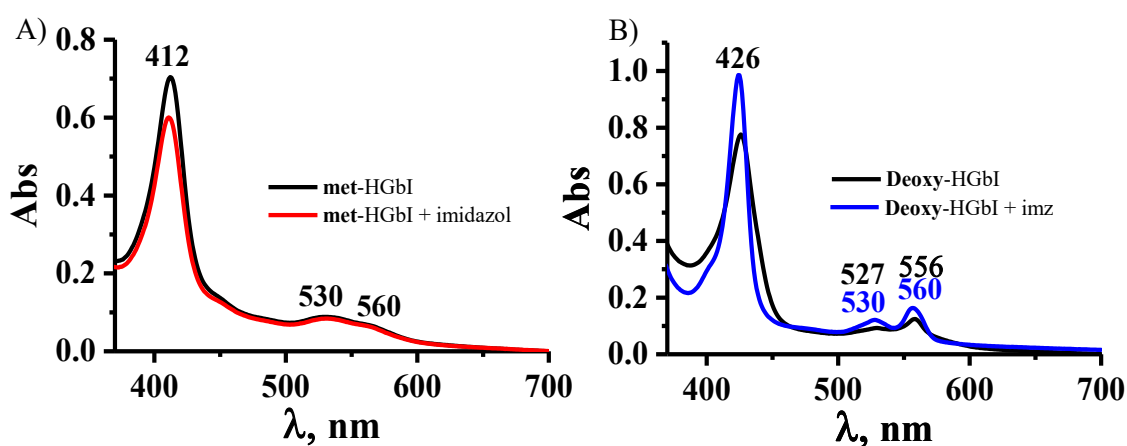


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na presença de imidazol, não foi observada histerese e o valor de  $E_m$  para a proteína HGbI foi determinado em  $-330 \text{ mV vs EPH}$ . O valor obtido é 23 mV mais negativo se comparado ao valor determinado na ausência de ligantes exógenos ( $-307 \text{ mV vs EPH}$ ). Além da proximidade no valor de  $E_m$  e da similaridade nos perfis espectroscópicos quando comparada

à condição em que não havia ligantes exógenos no meio, a titulação não apresentou histerese sugerindo, fortemente, que o imidazol não se liga a proteína na condição estudada. Outra hipótese passível de consideração é a de que a proteína já se encontrava ligada a imidazol desde o início da titulação espectroeletróquímica, uma vez que uma das etapas de purificação envolve a utilização deste ligante. Para desligar a proteína da coluna de afinidade (ver metodologia), concentrações crescentes de imidazol são adicionadas. A remoção de imidazol é feita por meio de diálise e, caso esta não seja efetiva, pode resultar em quantidades de imidazol suficientes para se ligar à proteína. Para avaliar essa hipótese, realizou-se uma nova expressão da proteína seguindo os mesmos procedimentos descritos na metodologia, porém, ao desligar a proteína da coluna de afinidade, ao invés de utilizar imidazol, foi utilizada a variação de pH. Iniciou-se a lavagem da coluna com tampão tris 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0 posteriormente, foi iniciada a lavagem com tampões PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> com pH 7,0; 6,0; 5,5; 5,0; 4,0; 3,5 e 3,0, e apenas neste último valor houve a eluição da proteína. Após esta etapa, a proteína foi concentrada e o pH ajustado para 7,4 em tampão PBS 10 mmol L<sup>-1</sup>. A Figura 16 ilustra os espectros obtidos seguindo essa metodologia.

Figura 16 – Perfil espectroscópico da proteína HGBI nas condições oxidada e reduzida após remoção da coluna de afinidade com variação do pH. A) met-HGBI na ausência (linha vermelha) e presença de imidazol (linha roxa). B) desoxi-HGBI na ausência (linha preta) e na presença de imidazol (linha azul).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Nas formas oxidada e reduzida da proteína, não foi possível observar variações espectroscópicas significativas que sugerissem a ligação da proteína ao imidazol. Em ambas as condições, o espectro não se alterou, mesmo após a adição de imidazol 50 mmol L<sup>-1</sup>. Esse resultado indica que a proteína não se liga ao imidazol durante o processo de purificação e,

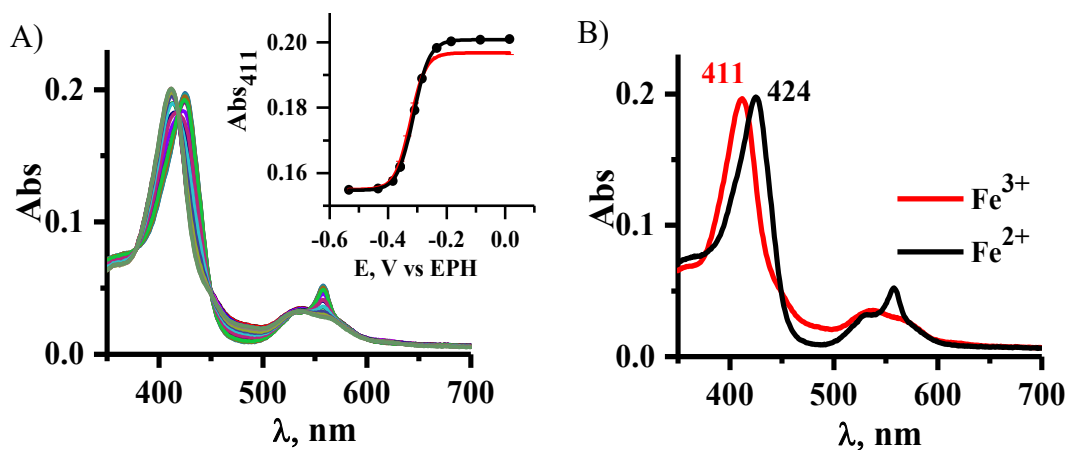
consequentemente, não deve se ligar durante a titulação espectroeletroquímica. Sendo assim, o valor de  $E_m$  de -330 mV vs EPH (Figura 14) deve corresponder a uma titulação sem ligantes exógenos, uma vez que, possivelmente, a proteína apresenta baixa ou nenhuma afinidade pelo ligante. Comparativamente a condição em que se realizou a titulação na ausência de ligantes esperavam-se alterações significativas na região da Soret e bandas Q após adição de imidazol; resultado este que não foi observado.

Apesar da diferença de -27 mV entre os valores de  $E_m$  para as titulações na ausência de ligantes e na presença de imidazol, os espectros da proteína após a purificação utilizando variação de pH (Figura 16) e a ausência de histerese na titulação sugerem, fortemente, que a ligação ao imidazol não ocorre.

#### **4.2.3 Oxi- HGBI**

Outro ligante exógeno de grande relevância para hemoproteínas é o oxigênio. Essa molécula se coordena à proteína no estado reduzido ( $Fe^{II}$ ), sendo a natureza dessa ligação bastante descrita na literatura [52,53]. Assim, foram realizados experimentos para determinar o valor de  $E_m$  da proteína HGBI em meio aeróbico. Inicialmente, foi aplicado um potencial de -16 mV para garantir que a proteína estivesse na forma oxidada e sem ligantes. Como ilustrado na Figura 17, a forma met foi evidenciada pela banda Soret em 411 nm e por uma banda  $\beta$  em 535 nm com um ombro em 564 nm. A titulação espectroeletroquímica foi realizada de -16 a -534 mV vs EPH. Após verificar a ausência de variações no espectro na forma oxidada, passou-se a aplicar potencial no sentido redutivo com intervalos de 50 e 25 mV, mantendo-se 10 minutos para estabilização da absorvância em cada valor aplicado, similarmente ao descrito para as amostras anteriores. Como pode ser visto na Figura 17B, verificou-se um deslocamento da banda em 411 nm para 424 nm e o aparecimento das bandas  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente, em 530 e 557 nm, indicando a conversão da proteína de sua forma oxidada à reduzida e hexacoordenada.

Figura 17 - Titulação espectroeletróquímica da proteína HGBI em meio aeróbico. A) Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores A a F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 411 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGBI (preto) e desoxi-HGBI (vermelho).



Fonte:

Elaborado pelo autor (2020).

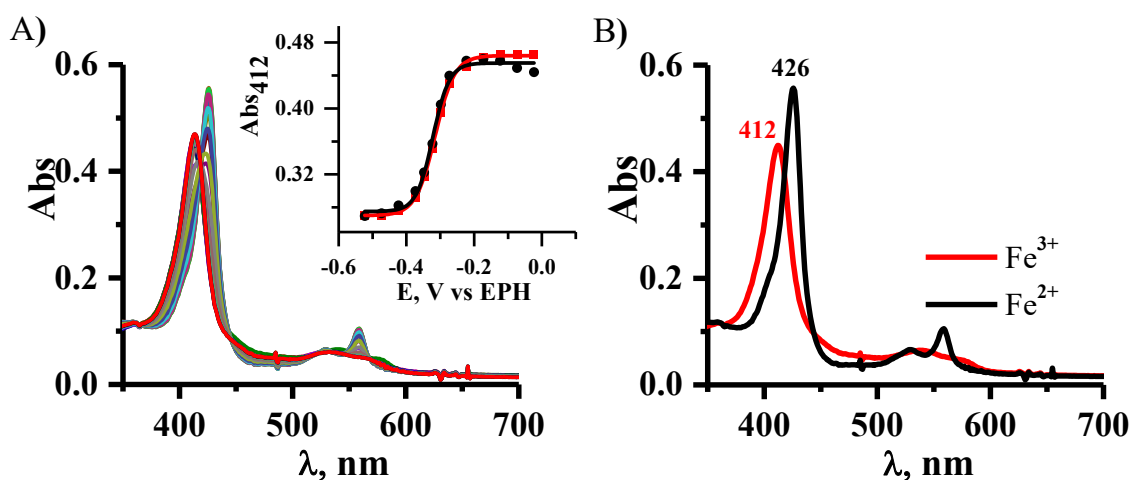
O valor de  $E_m$  da proteína HGBI em meio aeróbico e na ausência de ligantes foi calculado em  $-313 \text{ mV vs EPH}$  estando bem próximo daquele obtido para a proteína na ausência de ligantes (condição anaeróbica,  $E_m = -307 \text{ mV}$ ). Sabendo-se [16] que o valor de  $K_d$  para a proteína ligada a  $\text{O}_2$  é de  $0,53 \times 10^{-9}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,0), esperava-se obter o perfil espectroscópico tipicamente associado à esta condição após redução em meio aeróbico. O espectro apresentado na Figura 17B (curva preta), todavia, não corresponde aquele reportado para a proteína ligada a  $\text{O}_2$  [16]. Esse resultado foi atribuído à possível redução eletroquímica do oxigênio o que impossibilitou a medida do valor de  $E_m$  para a proteína na presença de oxigênio.

#### 4.2.4 Cianomet – HGBI

Para realização da titulação espectrofotométrica na presença do ligante cianeto, alterou-se o pH do meio para 9,5, visto que o valor de  $pK_a$  do ácido cianídrico (HCN), uma substância volátil, é 9,2. Antes dos experimentos contendo íons  $\text{CN}^-$ , realizou-se uma titulação em condição anaeróbica sem ligantes exógenos, na presença de mediadores e em pH 9,5 a fim de avaliar o comportamento espectroscópico nestas condições. As curvas obtidas estão ilustradas na Figura 18.

Inicialmente, aplicou-se o potencial de -73 mV por 15 minutos para obtenção da forma oxidada sem ligantes, evidenciada pela Soret em 412 nm e pela presença da banda  $\beta$  em 533 nm com um ombro da banda  $\alpha$  em 560 nm. Posteriormente, aplicou-se potenciais no sentido negativo até a obtenção da forma reduzida sem ligantes, evidenciada pela Soret em 426 nm e pela presença das bandas  $\beta$  e  $\alpha$  em 530 e 560 nm, respectivamente. O valor de  $E_m$  calculado neste experimento foi de -315 mV, que se encontra praticamente idêntico ao medido em pH 8,0.

Figura 18 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGbI na ausência de ligantes. A) Variações espectroscópicas da proteína HGbI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 9,5) e  $\text{NaCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A à F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo ( $\bullet$ ) e redutivo ( $\blacksquare$ ). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGbI (preto) e desoxi-HGbI (vermelho).

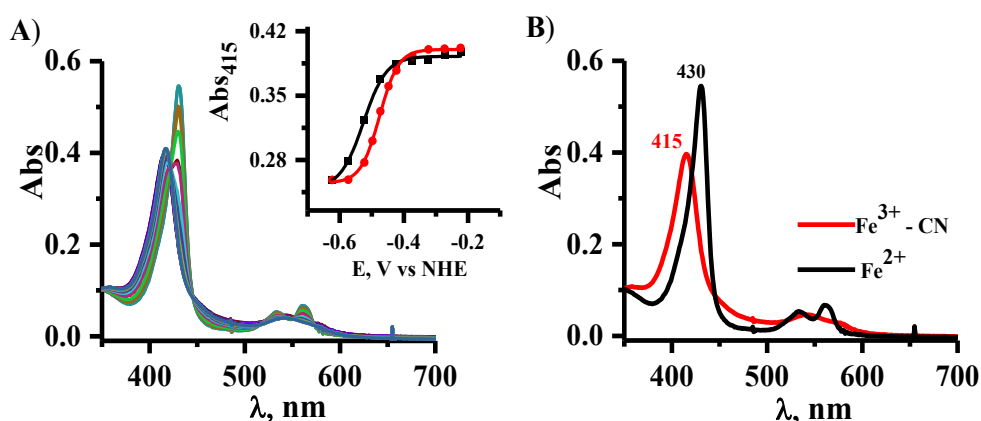


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Em seguida, realizou-se a titulação potenciométrica da proteína HGbI nas mesmas condições da Figura 18, mas acrescentando-se  $\text{NaCN } 4 \text{ mmol L}^{-1}$ ; cujas curvas são apresentadas na Figura 19. De acordo com a literatura [23,25,54], hemoproteínas se ligam ao íon cianeto quando no estado oxidado ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ). Sendo assim, aplicou-se um potencial de -223 mV durante 15 minutos, a fim de garantir a obtenção do estado oxidado da proteína e ligada ao íon  $\text{CN}^-$ . De fato, essa condição foi verificada através das mudanças espectroscópicas na banda Soret em 415 nm e da banda  $\beta$  em 544 nm com ombro referente a banda  $\alpha$  em 565 nm. Em seguida, foram aplicados potenciais no sentido redutivo com intervalos de 25 e 50 mV até a obtenção do perfil espectral típico da forma reduzida com banda Soret em 430 nm, como ilustrado na Figura 18B. Posteriormente, os mesmos valores de potenciais foram aplicados no sentido inverso,

sendo observada a presença de histerese no sistema, cujos valores de  $E_{ox}$  e  $E_{red}$  foram calculados em -475 e -524 mV, respectivamente. Esse comportamento se deve, possivelmente, à dissociação do ligante cianeto após a redução da proteína. Por meio dos dados espectrais obtidos em função do potencial, o valor de  $E_m$ , nesse caso, foi calculado em -501 mV.

Figura 19 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGBI na presença do ligante cianeto. A) Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 9,5) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A à F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ) e NaCN  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Inserção: Variação da absorvância em 415 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas cianomet-HGBI (preto) e desoxi-HGBI (vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Comparativamente ao valor determinado em pH 9,5 (Figura 17,  $E_m = -315 \text{ mV}$ ), observou-se um deslocamento de -186 mV na presença de íons  $\text{CN}^-$ . Esse comportamento era esperado, uma vez que o íon  $\text{CN}^-$  se liga à forma oxidada da proteína estabilizando-a nesse estado de oxidação. A Tabela 6 apresenta as equações químicas sugeridas para as etapas oxidativa e redutiva referentes a titulação espectroeletróquímica na presença de cianeto.

Tabela 6 – Equações químicas sugeridas para a titulação espectroeletróquímica na presença do ligante cianeto nos sentidos oxidativo e redutivo.

Condição experimental	Etapa redutiva	Etapa oxidativa
Presença de $\text{CN}^-$	$\text{Fe(III)-CN}^- + e^- \rightarrow \text{Fe(II)-CN}^-$ $\text{Fe(II)-CN}^- \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{CN}^-$	$\text{Fe(II)} + \text{CN}^- \rightarrow \text{Fe(III)} + e^- + \text{CN}^-$ $\text{Fe(III)} + \text{CN}^- \rightleftharpoons \text{Fe(III)-CN}^-$

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Em outras palavras, essa condição torna necessária a aplicação de potenciais ainda mais negativos para a redução da proteína. Relativamente a outras hemoproteínas, como a DevS [23] e a FixL [25], a proteína HGbI apresentou tendência similar. Considerando o  $\Delta E_m$  (variação do potencial do ponto médio em relação a condição sem ligantes exógenos e na presença de cianeto), a proteína HGbI apresentou valor de -186 mV, enquanto para as proteínas DevS e FixL foram observadas variações de -217 e -175 mV, respectivamente. A proteína HRP [50] apresentou variação de -126 mV enquanto a maior diferença, -400 mV, foi observada para a mioglobina [55].

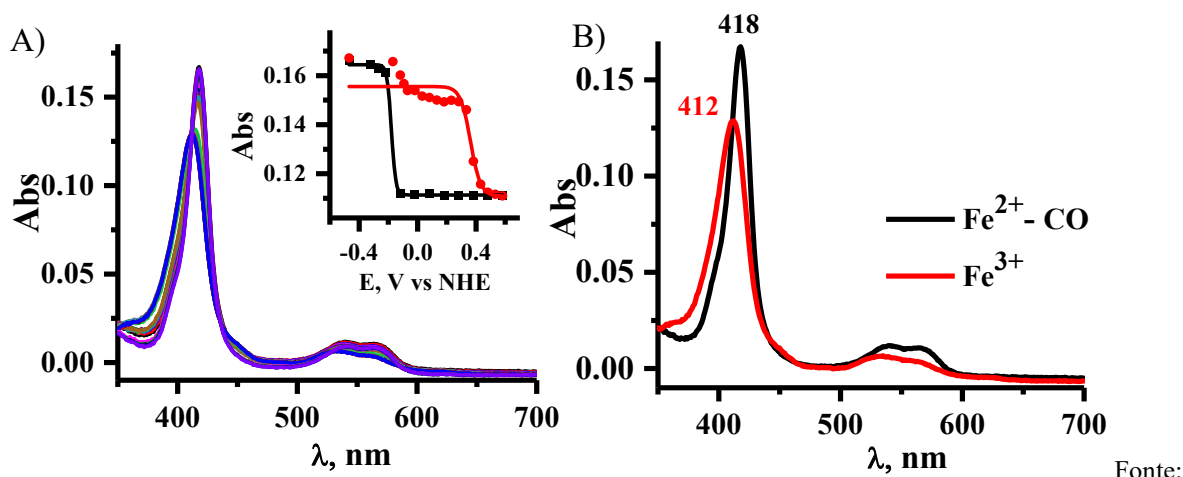
Os valores de  $E_m$  calculados na presença de cianeto para as proteínas DevS, FixL, HRP e mioglobina, bem como para a HGbI, apresentaram tendência similar, sendo observado valores mais negativos de  $E_m$  quando os experimentos são realizados na presença deste ligante exógeno.

#### **4.2.5 CO – HGbI**

Com objetivo de determinar o valor de  $E_m$  da proteína em sua forma ligada ao CO, a titulação espectroeletróquímica foi realizada em solução tampão saturada, condição obtida após 30 minutos de fluxo constante de CO na solução. A literatura [23,25,56] reporta que hemoproteínas se apresentam coordenadas ao CO essencialmente no estado reduzido ( $Fe^{II}$ ). Dessa forma, após adição da proteína à solução, aplicou-se potencial de -468 mV a fim de obtê-la em sua forma ligada a CO. Após 15 minutos de aplicação de potencial para estabilização da absorbância da forma completamente reduzida da proteína, foi observada a banda Soret em 417 nm e duas absorções de baixa intensidade na região das bandas Q indicando a ligação da proteína HGbI à molécula de CO, similarmente ao espectro descrito na literatura (Figura 20). Aplicou-se, então, potenciais mais positivos em intervalos de 50 mV para oxidar a proteína. A presença da banda Soret em 412 nm no espectro ilustrado na Figura 20B (curva preta) indica que a forma oxidada da proteína sem ligantes (desoxi-HGbI) foi obtida após aplicação de potenciais positivos.



Figura 20 - Titulação espectroeletróquímica da proteína HGBI em meio anaeróbico saturado de CO. A) Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores de A à H ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ). Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas CO-HGBI (preto) e met-HGBI (vermelho).



Fonte:

Elaborado pelo autor (2020).

Ao analisar a variação da absorvância em 412 nm na inserção da Figura 17A, pode-se observar uma diminuição sutil nos valores de absorvância ao aplicar potenciais positivos. Próximo de 300 mV, entretanto, há uma variação mais brusca de absorvância. O deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos ocorreu conforme o previsto, uma vez que a proteína no estado ferroso apresenta grande afinidade por CO ( $K_d = 0,67 \times 10^{-9}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7,0) [16], um ligante  $\pi$ -acceptor que estabiliza o estado  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Após obter a forma oxidada, evidenciada pela banda Soret em 412nm, realizou-se a titulação no sentido redutivo e, para isto, foram aplicados potenciais de 582 a -468 mV em intervalos de 100 e 50 mV. A comparação entre as curvas obtidas nos sentidos redutivo e oxidativo mostram a presença de grande histerese com valores de  $E_{\text{ox}}$  e  $E_{\text{red}}$  de 358 e -182 mV, respectivamente, sendo o valor de  $E_m$  88 mV.

O valor de  $E_m$  determinado para a HGBI na presença de CO parece seguir um tendência similar ao observado para a proteína DevS [23], em que o potencial do ponto médio apresentou deslocamento para valores mais positivos se comparado a condição sem ligantes exógenos. Porém, ao considerar o  $\Delta E_m$ , para as duas proteínas os valores mostram bastante distintos, enquanto a HGBI apresentou  $\Delta E_m$  de 395 mV, para a DevS esse valor foi de apenas

106 mV. Para a proteína FixL na presença de CO o valor de  $E_m$  praticamente não foi [25] alterado se comparado a condição sem ligantes.

A Tabela 7 resume os valores de  $E_m$  calculados para a proteína HGbI nas condições estudadas, além dos valores de comprimento de onda das bandas Soret e bandas Q.

Tabela 7 -Valores de  $E_m$  calculados para a HGbI e os valores correspondentes as bandas Soret e bandas  $\beta$  e  $\alpha$  nas condições estudadas.

Condição	$E_m$ (mV)	Forma	Soret	Bandas Q ( $\beta$ e $\alpha$ )	
Sem Ligantes exógenos	-307	met	412	535	558
		desoxi	422	530	559
Presença de imidazol	-330	met	411	532	553
		desoxi	424	535	565
Presença de Oxigênio	-313	met	411	535	564
		desoxi	424	530	557
$CN^-$	-501	met	415	544	565
		desoxi	430	535	562
CO	88*	met	412	531	555
		desoxi	418	540	565

\*Forte histerese,  $E_{ox}$ : 358 mV,  $E_{red}$ : -182 mV

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foi possível determinar para a proteína HGbI o valor de  $E_m$  de -307 mV na ausência de ligantes exógenos. Para as titulações na presença de CO e  $CN^-$ , foram observados deslocamentos para valores positivo e negativo, respectivamente. Comportamento similar foi observado para outras hemoproteínas, embora sem a ocorrência de uma histerese tão grande. Para a proteína HGbI, observou-se uma histerese superior a 500 mV. Experimentos futuros devem ser realizados a fim de entender esse comportamento.

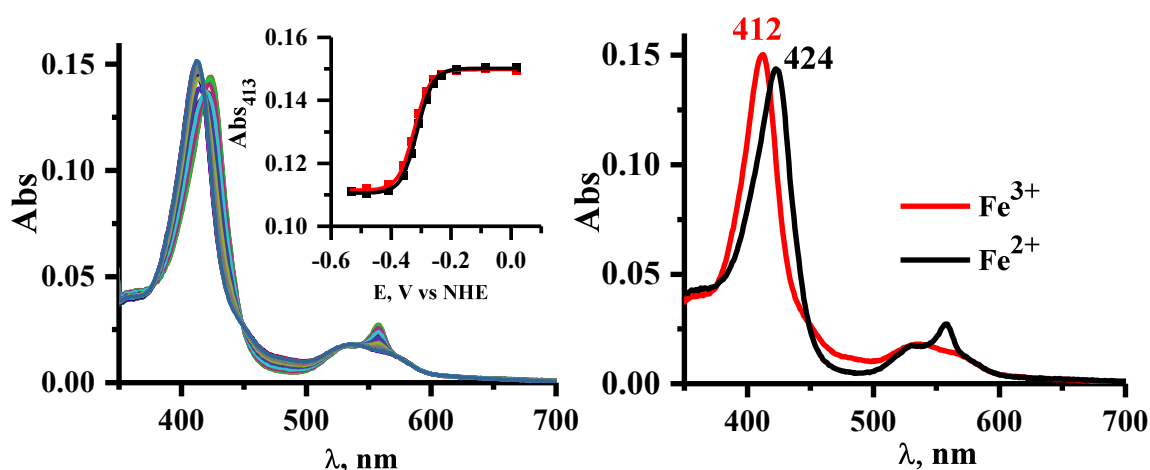
Para a titulação na presença de  $O_2$ , obteve-se um valor de  $E_m$  (-313 mV) próximo à condição sem ligantes exógenos (-307 mV) sugerindo que esta espécie não se liga ao íon ferro do grupo heme.

#### 4.2.6 Espectroeletróquímica na presença de acetato

De acordo com a literatura [16], a proteína HGBI, diferentemente de outras hemoproteínas, se liga ao íon acetato quando na forma oxidada. Com o objetivo de estudar a natureza da ligação da proteína HGBI a essa espécie, realizou-se uma titulação potenciométrica cujas curvas encontram-se ilustradas na Figura 21.

Ao iniciar o experimento, aplicou-se um potencial de 17 mV por 15 minutos a fim de oxidar completamente a proteína. A partir da obtenção do espectro da forma oxidada, o potencial foi aplicado de 17 a -533 mV vs EPH em intervalos de 50 e 25 mV. Esperava-se, entretanto, que o acetato se ligasse a esta forma, o que parece não ter ocorrido, uma vez que o espectro eletrônico sugere a forma  $\text{Fe}^{\text{III}}$  sem ligantes, evidenciado pela banda Soret em 412 nm e pela presença de uma banda  $\beta$  em 535 nm, tal como observado na titulação na ausência de ligantes exógenos (Figura 14).

Figura 21 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGBI na presença de acetato  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ . A) Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris (pH 8,0) e NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo os mediadores A à F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ) acetato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . Inserção: Variação da absorvância em 412 nm em função do potencial nos sentidos oxidativo (●) e redutivo (■). B) Espectros eletrônicos calculados para as formas met-HGBI (preto) e desoxi-HGBI (vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

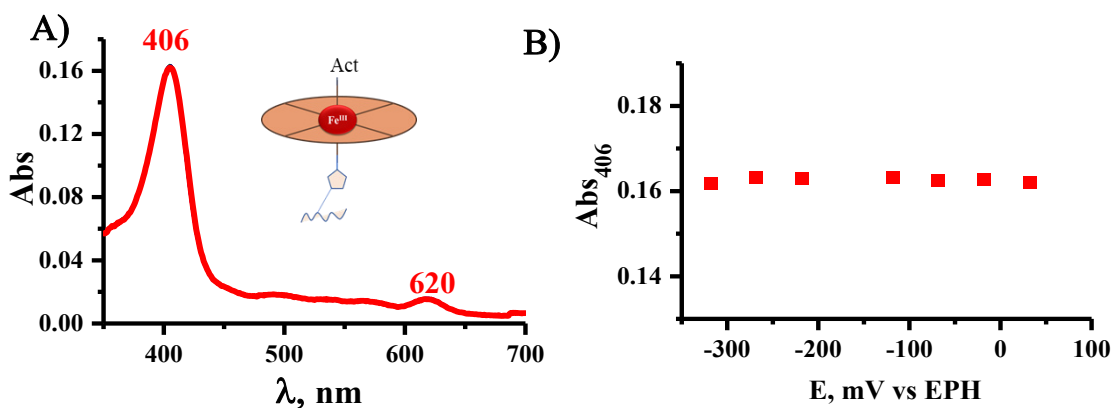
Realizou-se a titulação no sentido redutivo, em que se observou o deslocamento da banda em 412 nm para 424 nm e o surgimento de duas bandas,  $\beta$  e  $\alpha$ , em 530 nm e 559 nm,

respectivamente. A banda  $\alpha$  apresentou maior intensidade em relação a  $\beta$ , o que sugere um estado reduzido hexacoordenado com resíduo endógeno. Após a obtenção da forma reduzida, verificou-se a reversibilidade do sistema, realizando-se a titulação no sentido oxidativo nos mesmos intervalos de potencial aplicados. O valor de  $E_m$  determinado nessa condição foi de -312 mV, valor similar ao obtido para a titulação realizada na ausência de ligantes (Figura 14). A ausência de histerese, em conjunto com a presença de apenas um ponto isobéstico, sugere que a ligação com acetato não ocorre na condição estudada ou que não provoca qualquer perturbação nessas medidas.

Ao realizar o experimento, esperava-se que o potencial do ponto médio da proteína na presença de acetato se modificasse em relação à condição em que se realizou o estudo na ausência de ligantes exógenos. O fato da molécula de acetato não se ligar ao centro metálico, pode estar relacionado ao valor de pH do meio, uma vez que essa interação foi reportada para a proteína em pH 4,6 [16]. Para validar essa hipótese realizou-se a titulação espectroeletroquímica em tampão acetato pH 5,0. Os gráficos obtidos no experimento estão ilustrados na Figura 22.

Ao iniciar o experimento, aplicou-se por 15 minutos um potencial de 50 mV de modo a garantir que a proteína se encontrasse totalmente oxidada e ligada a acetato (Act-HGbl/Fe<sup>3+</sup>). Aguardou-se até não serem observadas variações espectroscópicas na banda Soret, em 406 nm, e em uma absorção de baixa intensidade em 620 nm. O perfil espectroscópico obtido foi similar ao reportado na literatura, evidenciando a ligação da proteína ao acetato [16]. Comparativamente aos espectros obtidos em pH 5,0 na presença de acetato (Figura 22), nos quais não são observadas variações espectroscópicas (as curvas das titulações de redução e oxidação estão sobrepostas), aqueles obtidos em pH 8,0 (Figura 21) coincidem com os resultados publicados e indicam a ligação do acetato sugerindo que a afinidade da proteína por esta molécula é dependente do pH.

Figura 22 - A) Espectros eletrônicos da proteína HGbI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em função do potencial aplicado em uma solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão acetato (pH 5,0) contendo os mediadores A à F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ). B) Variação da absorvância da Soret (406 nm) da proteína ao variar o potencial.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

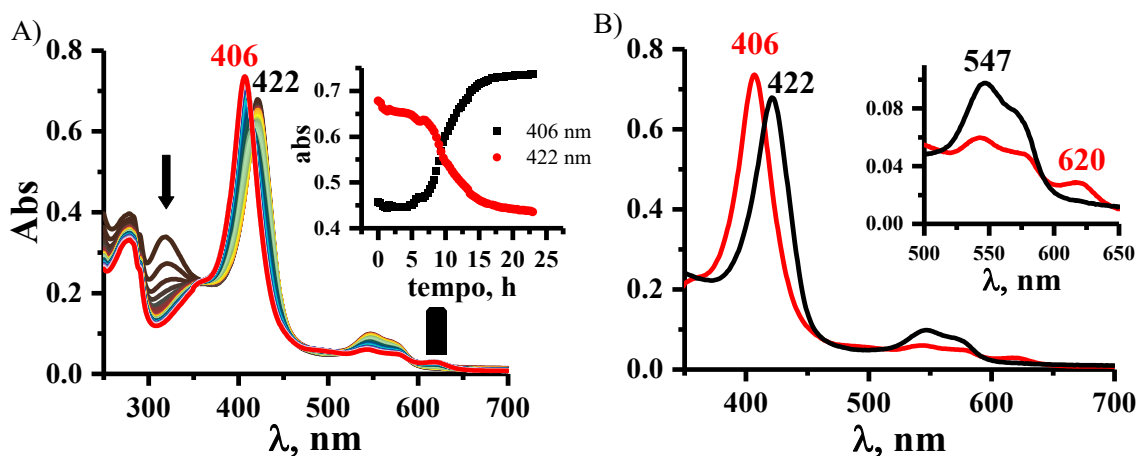
Após verificar a ocorrência da ligação, iniciou-se a titulação no sentido redutivo, varrendo o potencial de -50 a -450 mV, aplicando valores de 100 e 50 mV no sentido negativo. Curiosamente, não foram observadas variações espectroscópicas ao aplicar os potenciais negativos, não sendo possível, assim, concluir a titulação. Pode-se observar, entretanto, um comportamento anômalo. Devido à estimativa de valor de  $E_m$  na região de -200 a -400 mV, esperava-se que a proteína fosse convertida ao estado reduzido quando da aplicação dessa faixa de potencial. A proteína, entretanto, não apresentou perfil espectroscópico associado à forma reduzida, mesmo aplicando valores de potencial de -450 mV.

Nessa perspectiva, duas hipóteses podem explicar a ausência de variações espectroscópicas em função do potencial aplicado. A primeira seria considerar que o acetato estabiliza o estado oxidado da proteína, de modo que seria necessário aplicar valores de potencial muito mais negativos. A segunda hipótese seria considerar a conversão catalítica do acetato em um subproduto através de uma reação de oxirredução envolvendo o grupo heme. Ao aplicar potencial em uma região suficientemente redutiva, a proteína seria convertida à forma reduzida e, posteriormente, devido à grande disponibilidade de acetato no meio, seria reconvertida à forma oxidada catalisando a reação de redução do acetato. A segunda hipótese parece ser mais consistente com o resultado observado. Essa possibilidade é corroborada por resultados em que se observou uma oxidação anômala da proteína HGbI na presença de acetato e na ausência de oxigênio. Com o intuito de observar e validar essa hipótese foram realizados testes catalíticos preliminares envolvendo a proteína na condição estudada.

#### 4.2.7 Testes catalíticos de redução de acetato pela proteína HGBI

O sistema foi preparado em condições similares ao teste de espectroeletrólise em uma câmara anaeróbica, porém, sem a presença dos mediadores. O meio foi tamponado em pH 5,0 com tampão acetato 100 mmol L<sup>-1</sup> e a proteína foi quimicamente reduzida com ditionito de sódio 1 mmol L<sup>-1</sup>. Após adicionados à cubeta, o sistema foi vedado e levado ao espectrofotômetro onde se realizou o acompanhamento da reação por 24 horas, sendo coletados espectros em intervalos de 20 minutos.

Figura 23 – Oxidação da proteína HGBI 7 μmol L<sup>-1</sup> em meio anaeróbico em tampão acetato 100 mmol L<sup>-1</sup> em pH 5,0. A) Acompanhamento espectroscópico da oxidação da proteína durante 24 horas. Inserção: Acompanhamento das absorvâncias das bandas em 422 (desoxi-HGBI) e 406 nm (Act-HGBI) em função do tempo. B) Perfis espectroscópicos obtidos para a HGBI na forma reduzida (preto) e na forma oxidada ligada a acetato (vermelho). Inserção: Bandas Q referentes a forma reduzida da proteína no início do experimento (preto) e referente a forma oxidada ligada a acetato (vermelho) ao final do experimento.



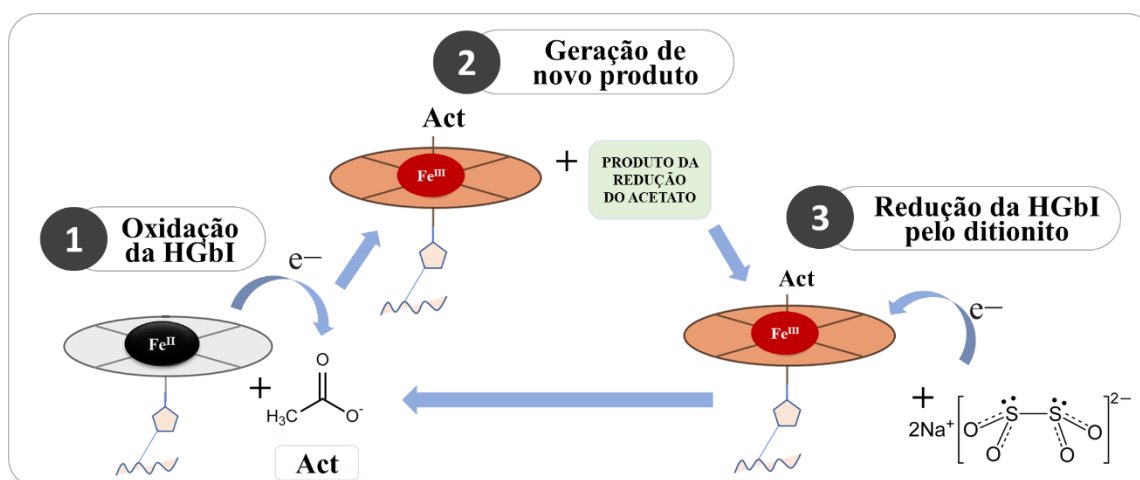
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Após cerca de 7 horas de reação, observou-se uma acentuada variação na absorvância da banda em 422 nm, sugerindo que a proteína, em sua forma reduzida, estava experimentando algum processo químico. Gradativamente, a banda em 422 nm foi deslocada para 406 nm apresentando, após cerca de 16 horas de reação, valores constantes de absorvância, como ilustrado na inserção da Figura 23A. Além das bandas Soret, as bandas Q também evidenciam a ocorrência da conversão da proteína da forma reduzida à oxidada sem aplicação de qualquer potencial elétrico. Na forma reduzida sem ligantes, a proteína apresentou uma

banda  $\beta$  em 547 nm com um pequeno ombro a direita, tal evidência espectroscópica sugere um estado reduzido sem ligantes. No decorrer do tempo, observou-se o gradativo desaparecimento da banda em 547nm e o surgimento de uma banda em 620 nm, característica da proteína em sua forma oxidada ligada a acetato.

Como não houve aplicação de potencial externo, algum componente do sistema foi responsável por promover o processo de oxirredução. Uma hipótese inicial seria considerar a auto oxidação da proteína, mecanismo observado em globinas e hemoglobinas quando ligadas a oxigênio [57]. Essa possibilidade, entretanto, não parece ser plausível, uma vez que testes previamente realizados com a HGbI sugerem que a proteína não experimenta auto oxidação, mesmo com 24 h de monitoramento [16]. Convém, ainda, mencionar que essa conversão não parece ocorrer por eventual entrada de oxigênio na cubeta, o que poderia justificar uma oxidação, já que não há espectros da proteína nessa forma e sim pontos isobésticos bem definidos. Outra hipótese seria considerar que a HGbI promove a conversão catalítica do acetato, reduzindo-o a um novo produto, tal como ilustrado na Figura 24.

Figura 24 - Proposta de ciclo catalítico para HGbI na presença de acetato.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Nesse caso, em uma primeira etapa, a proteína, na forma reduzida e pentacoordenada, experimentaria uma oxidação no grupo heme levando, conseqüentemente, à redução do acetato, espécie em maior quantidade no meio. O desaparecimento da banda em 422 nm pode ser explicado por esse processo. Na segunda etapa, após a formação do novo produto, o acetato em excesso presente no meio se ligaria à proteína resultando no perfil espectroscópico observado na Figura 23, com uma Soret em 406 nm e a banda Q em 620 nm. Na terceira etapa, a proteína seria levada de volta à forma reduzida devido à presença, no meio reacional, de

ditionito em concentração elevada ( $\sim 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A ausência de mudanças espectroscópicas antes de 7 horas de reação pode ser explicada pelo processo sugerido na etapa 3. Admitindo que todo o ditionito é consumido após 7 horas de reação, a proteína passou a reduzir o acetato e a ser convertida à forma oxidada.

Considerando que todo ditionito adicionado atuou apenas como agente redutor da proteína, não experimentando dissociação, este definiria, ao final, a quantidade de produto gerado. Nesse caso, como foi utilizado cerca de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  do agente redutor, o produto formado, possivelmente, também apresenta essa ordem de grandeza. Para a identificação do produto outros testes de natureza qualitativa e quantitativa ainda necessitam ser realizados.

### 4.3 Influência do pH no valor de $E_m$

O estudo da variação do valor de  $E_m$  em função do pH se mostra particularmente relevante para a proteína HGBI, uma vez que a mesma apresenta, quando na forma reduzida ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ), um equilíbrio entre as formas penta e hexacoordenada que, porventura, pode vir a influenciar os valores de  $E_m$  do ferro do Heme. A medida que o pH do meio é basificado, ocorre um incremento na população de proteínas na forma hexacoordenada devido a coordenação de um resíduo de aminoácido na posição distal do grupo heme, evidenciado pelo aumento na intensidade da banda  $\alpha$  em relação a  $\beta$  [16].

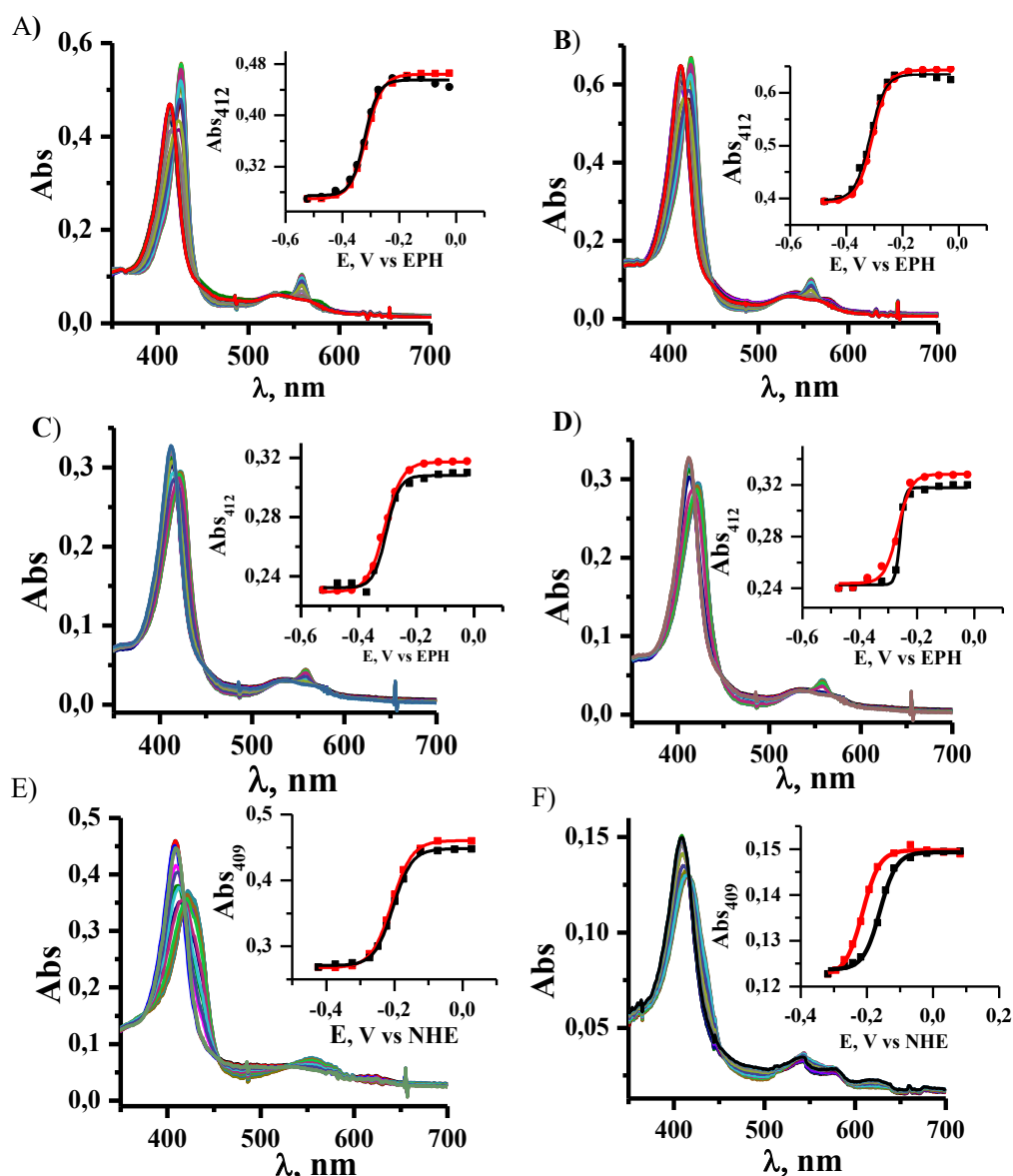
Outros estudos analisaram a dependência do potencial do ponto médio com o pH em proteínas que apresentam o grupo heme. Por exemplo, Barreto e colaboradores [23] observaram para a hemeproteína DevS que o potencial do ponto médio varia em função do pH e essa variação se deve possivelmente aos grupos propionatos do heme que são protonados/desprotonados e, conseqüentemente, modificam o valor de  $E_m$ . De maneira similar, observou-se para a citocromo PccH do microrganismo *Geobacter sulfurreducens*, uma dependência do valor de  $E_m$  com pH também atribuída aos grupos propionatos [58].

Em outro caso, utilizando eletroquímica direta, observou-se para a mioglobina [59], que também pertence à família das globinas tal como a HGBI, uma dependência linear do potencial do ponto médio com o pH que foi atribuída possivelmente a um equilíbrio ácido-base envolvendo resíduos de aminoácidos nas proximidades do heme ou a um equilíbrio água-hidróxido, em que uma molécula de água se coordena a mioglobina na forma oxidada, e em condição básica, essa molécula de água é desprotonada, levando a possíveis alterações no valor do potencial do  $E_m$  [60].



Para avaliar a influência do pH no valor de  $E_m$  da proteína HGBI foram realizadas titulações espectroeletróquímicas sem ligantes, em meio anaeróbico e na presença de mediadores nos seguintes valores de pH: 3,5; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 9,5. As curvas obtidas encontram-se ilustradas na Figura 25.

Figura 25 - Titulação espectroeletróquímica em meio anaeróbico da proteína HGBI na ausência de ligantes e em soluções de diferentes valores de pH. Variações espectroscópicas da proteína HGBI ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante a titulação potenciométrica em uma solução contendo NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  e os mediadores A à F ( $25 \mu\text{mmol L}^{-1}$ ) em  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão tris pH 9,5 (A); 9,0 (B); 8,0 (C); 7,0 (D); 6,0 (E) e 3,5 (F). Inserções: Variação da absorvância através da Soret em função do potencial nos sentidos redutivo (●) e oxidativo (■).



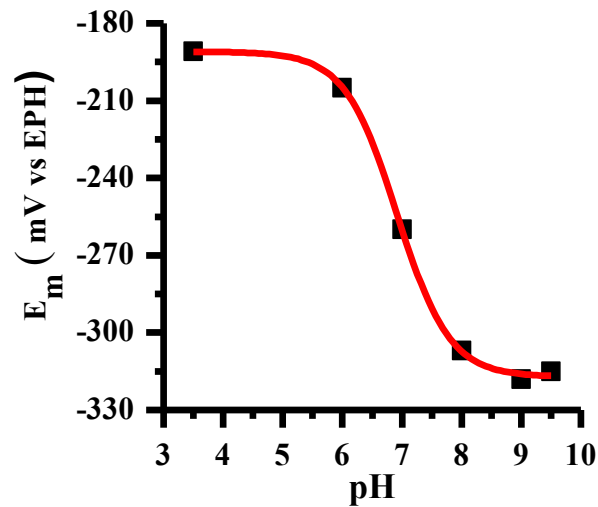
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Para a realização desses experimentos, os potenciais aplicados no início foram diferentes para cada valor de pH, a saber: 82 mV (pH 3,5), 27 mV (pH 6), -23 mV (pH 7,0 e 8,0), -30 mV (pH 9,0) e -73 mV (pH 9,5). Esses potenciais foram aplicados até a obtenção da proteína na forma completamente oxidada (met-HGbI) procedendo de forma similar ao descrito para os sistemas anteriores. Em seguida, os potenciais foram aplicados no sentido negativo com intervalos de 50 e 25 mV até -318 mV (pH 3,5), -423 mV (pH 6,0), -473 mV (pH 7,0), -523 mV (pH 8,0), -478 mV (pH 9,0) e -523 mV (pH 9,5), quando se obteve a forma totalmente reduzida (desoxi-HGbI).

Uma vez finalizada a titulação redutiva, fez-se a varredura oxidativa a fim de verificar a reversibilidade dos sistemas e a possível presença de histerese. Comparativamente às curvas obtidas em pH 8,0,  $E_m$  -307 mV, os valores de  $E_m$  calculados em pH 9,0 e 9,5 foram de -318 e -315 mV, respectivamente. Os valores citados são próximos e sugerem que não há alterações significativas no valor de  $E_m$  para valores de pH  $\geq$  8,0. Para valores de pH menores que 8,0, houve alterações significativas nos valores de  $E_m$ . Para as soluções de pH 7,0 e 6,0 ocorreu um aumento de, respectivamente, 47 e 102 mV em relação ao valor determinado em pH 8,0.

Todos os sistemas, com exceção da solução de pH 3,5, não apresentaram histerese significativa indicando a presença de apenas uma espécie no meio em suas formas oxidada e reduzida. Os dados obtidos mostram um deslocamento de  $E_m$  para valores positivos em meio ácido e para valores negativos quando se basicifica o meio. O gráfico ilustrado na Figura 26,  $E_m$  vs pH, apresenta um perfil sigmoidal demonstrando essa tendência. O equilíbrio ácido-base parece envolver fragmentos nas proximidades do grupo heme, uma vez que modifica o valor de  $E_m$ . Esse equilíbrio apresentou valor de pKa 6,9.

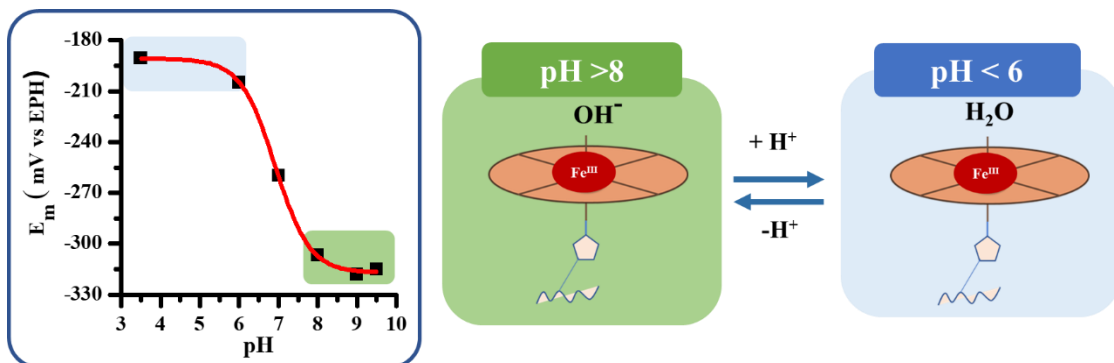
Figura 26 - Perfil do potencial do ponto médio ( $E_m$ ) da proteína HGBI *versus* pH do meio.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A modificação do pH do meio poderia sugerir a ocorrência de um equilíbrio envolvendo a água que estaria coordenada ao ferro na posição distal. Nesse caso, semelhante ao que acontece com a mioglobina oxidada [61], seria razoável considerar que a molécula de água coordenada na posição distal do grupo heme experimentasse ionização em meio básico formando hidroxila [60] o que poderia implicar em alterações no valor de  $E_m$ , tal como ilustrado no esquema apresentado na Figura 27.

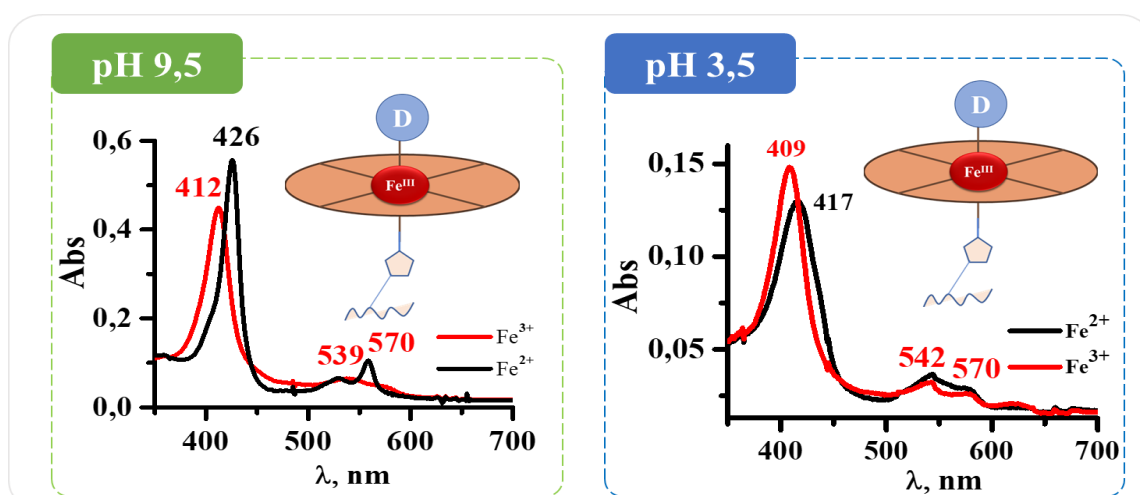
Figura 27- Esquema ilustrativo que representa a influência do equilíbrio envolvendo uma possível água na posição distal da hemeproteína no valor de potencial do ponto médio ao modificar o pH do meio.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Esse mecanismo, todavia, não parece ser operante no caso da proteína HGbI, uma vez que não foram observadas variações no espectro na região das bandas Q (ver Figura 28) na forma oxidada que justificassem a ocorrência desse equilíbrio. De fato, quando há esse equilíbrio, caso da mioglobina, variações espectrais consideráveis são observadas na região das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  ao modificar o pH [60].

Figura 28 - Perfis espectroscópicos obtidos para as formas totalmente oxidada (em vermelho) e totalmente reduzida (em preto) nas titulações espectroeletróquímicas realizadas em pH 3,5 e 9,5.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

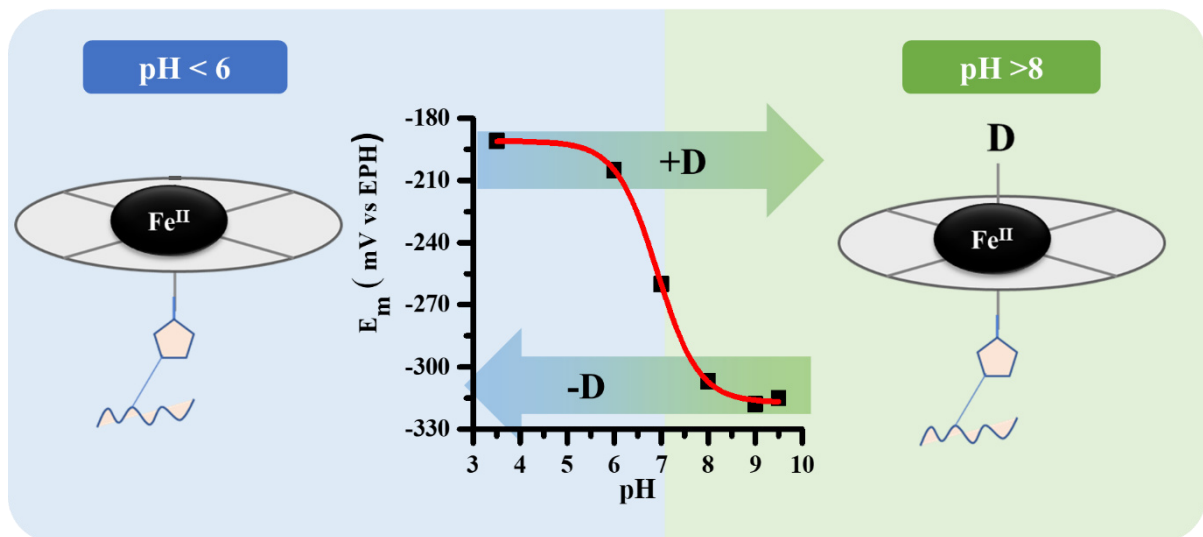
A análise dos perfis espectroscópicos obtidos para as formas totalmente oxidada da HGbI em pH 3,5 e 9,5 sugerem que a proteína se encontra hexacoordenada com um resíduo endógeno de aminoácido e não coordenada à água. Isso pode ser evidenciado pelo perfil das bandas Q que não apresentam alterações significativas, sendo os valores das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  similares nas duas condições estudadas.

Outra possibilidade que poderia justificar as alterações nos valores de  $E_m$ , seria o equilíbrio ácido-base dos grupos propionatos da porfirina do grupo heme. Esses grupos podem apresentar valores de pKa na faixa de 8,6 a 3,0, de modo que podem ser responsáveis pelo equilíbrio observado na proteína HGbI (pKa = 6,9). Dificilmente, entretanto, a perturbação no equilíbrio dos grupos propionatos provocaria tamanha alteração espectral como observada para a proteína HGbI neste estudo. Deve-se comentar, todavia, que é bastante curioso o fato de que outras hemeproteínas tiveram seus valores de pKa atribuídos ao grupo propionato da porfirina estando próximos ao que foi determinado para a proteína HGbI: pKa = 7,2 para citocromo c-

551 (*P. aeruginosa*) [62],  $pK_a = 8,6$  para Mb (*Aplysia*) [60] e  $pK_a = 7,3$  para DevS (*Mycobacterium tuberculosis*) [23].

Adicionalmente, não se pode descartar a influência do resíduo de aminoácido endógeno na posição distal sobre os valores de  $E_m$ . As variações espectrais na forma reduzida em função do pH sugerem, de fato, que um equilíbrio envolvendo protonação/desprotonação do resíduo endógeno resultaria em mudanças no valor de potencial, tal como ilustrado na Figura 29.

Figura 29 - Esquema ilustrativo representando a influência do resíduo endógeno da HgbI no potencial do ponto médio.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Em condição ácida, o resíduo de aminoácido endógeno na posição distal da HgbI na forma reduzida seria protonados, convertendo a proteína de sua forma hexacoordenada a pentacoordenada. Essa alteração justificaria a mudança de potencial do ponto médio para valores menos negativos. Os resultados espectroscópicos obtidos para as titulações evidenciam a ocorrência desse equilíbrio para a forma reduzida.

Para HgbI faz-se necessário, portanto, considerar quais resíduos endógenos de aminoácidos nas proximidades do grupo heme seriam capazes de se coordenar ao ferro, participar desse equilíbrio e, conseqüentemente, alterar o valor de  $E_m$ . Uma primeira hipótese seria considerar que uma histidina, relativamente comum na posição distal em globinas, seria o resíduo endógeno desconhecido que se coordena ao ferro. Ao analisar a estrutura cristalina da HgbI, porém, este resíduo não se apresenta nas proximidades da posição distal do heme [16].

Teixeira e colaboradores [63] observaram para a hemeproteína citocromo OmcF (*Geobacter sulfurreducens*) uma dependência do potencial redox em função do pH atribuída a um equilíbrio ácido-base envolvendo o resíduo HIS47. Em outro estudo [64], os mesmos autores evidenciaram o papel desse resíduo na modificação do potencial da OmcF utilizando proteínas mutantes em que a HIS47 foi substituída por outros resíduos não protonáveis. A análise do cristal da proteína OmcF permite supor que uma histidina está coordenada ao grupo heme, enquanto para HGbI, considerando a estrutura cristalina, não há resíduo de histidina coordenado na posição distal.

Apesar do valor de pKa para a proteína HGbI (pKa: 6,9) se mostrar próximo ao valor obtido para a OmcF ( $pK_{ox}=6,73$ ;  $pK_{red}=7,55$ ) sugerindo a presença do resíduo histidina, essa possibilidade não parece ser plausível. Além do impedimento estrutural, os valores de potencial do ponto médio obtidos para a HGbI são bastante negativos quando proteínas hexacoordenadas bis-histidínicas apresentam, frequentemente, valores positivos.

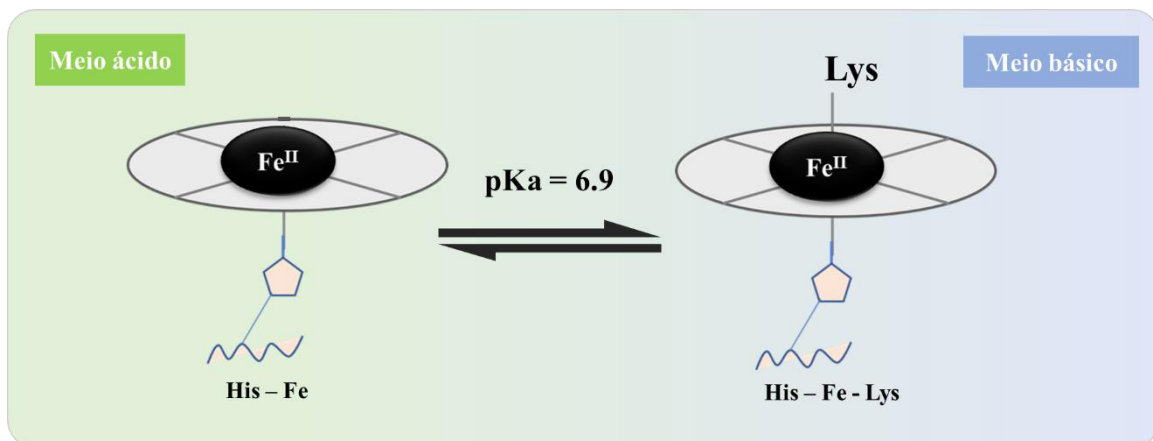
Uma outra possibilidade seria considerar a coordenação do resíduo Tyr29 ao íon ferro no grupo heme da HGbI. Estruturalmente, porém, não possível dada a distância de 5,3 Å, razoavelmente distante do grupo heme [16]. Outra hipótese a ser considerada seria a coordenação de uma lisina ao íon  $Fe^{II}$ . Para que a lisina mais próxima se coordenasse, seriam necessárias modificações estruturais nas hélices B e E e isso resultaria em um possível rompimento da dimerização [15]. Apesar disso, alguns fatores corroboram para hipótese de que esse resíduo endógeno se trata possivelmente de uma lisina. É necessário considerar que poucos são os sistemas descritos na literatura que reportam a lisina como um ligante na posição distal em hemeproteínas. A proteína HGbRL, encontrada no *Methylophilum infernorum*, apresenta uma lisina na posição distal [15]. Diferentemente da proteína HGbI, porém, não se observa uma coordenação dependente do pH na forma reduzida. Além da HGbRL, foram observadas lisinas coordenadas ao grupo heme na posição distal em hemeproteínas expressas pelo microrganismo *Chlamydomonas reinhardtii*, sendo elas as proteínas THB1 [65], THB2, e THB4 [45]. Os valores de  $E_m$  obtidos nas titulações realizadas na ausência de ligantes exógenos para esse conjunto de proteínas são negativos sugerindo, inicialmente, a coordenação do resíduo lisina na proteína HGbI, apesar do valor de potencial bem mais negativo.

As proteínas THB1, THB2, e THB4 apresentam uma dependência com o pH para a forma reduzida em que ocorre a transição para um estado hexacoordenado à medida que o pH é aumentado, sendo os perfis espectroscópicos observados similares ao da HGbI. Além disso,

os valores de pKa determinados para as proteínas THB1 (pKa = 6,5) e THB2 (pKa = ~7,0) são bastante próximos ao determinado para a HGBI (pKa = 6,9).

Considerando a discussão acima, parece ser razoável propor que o resíduo endógeno coordenado ao íon ferro do grupo heme da proteína HGBI seja lisina não havendo equilíbrio entre dois resíduos endógenos competindo por um mesmo sítio de ligação, similar ao observado para a proteína Gln-A [66]. Observa-se para essa última proteína na forma reduzida, a competição entre os resíduos lisina e histidina pela sexta posição de coordenação com o aumento do pH do meio [66].

Figura 30 - Esquema ilustrativo que representa o equilíbrio envolvendo o possível ligante lisina para a HGBI na forma reduzida.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Comparativamente às proteínas que contêm o resíduo lisina coordenado na posição distal, a proteína HGBI apresenta características similares tornando plausível a proposição deste resíduo como sexto ligante coordenado ao íon ferro do grupo heme da HGBI na forma reduzida (ver Figura 30). Essa proposição pode explicar a dependência do potencial do ponto médio com o pH do meio.

## 5 CONCLUSÃO

Uma vez expressa e purificada a proteína HGbI em sua forma *His-tagged*, utilizou-se a técnica espectroeletróquímica na presença de mediadores para determinar o potencial do ponto médio ( $E_m$ ) da hemoproteína HGbI sob diferentes condições, seja na ausência ou presença de diversos ligantes hêmicos, bem como sob vários pHs.

O valor de  $E_m$  determinado em pH 8,0 (-307 mV vs EPH) corrobora com a hipótese de que a proteína não parece atuar no armazenamento ou transporte de oxigênio [16], mas que sua função fisiológica parece estar envolvida em uma química redox. A hexacoordenação pode colaborar para manter o potencial da HGbI baixo no citosol do organismo o que seria necessário caso a mesma estivesse envolvida em uma transferência eletrônica ou em um processo de redução catalítica. Curiosamente, essa proteína em pH 8,0 apresentou reação de autoxidação extremamente lenta (mensurável somente à 50 °C,  $t_{1/2} = 8,2$  h) [16] um aparente paradoxo, que deve responder à sua reatividade e dependência com ligantes.

Os potenciais redox parecem depender da natureza dos ligantes como observado nas titulações na presença de CO e CN, entretanto, outros fatores como as cadeias laterais de aminoácidos e o ligante endógeno na posição distal, parecem ser bastante influentes na titulação com imidazol.

Os resultados apontam também um comportamento curioso no que se refere a dependência do  $E_m$  com o pH. Outras proteínas tiveram essa dependência relacionada ao comportamento ácido-base dos grupos propionatos do heme, entretanto, para HGbI não parece ser o caso. As mudanças espectrais na região das bandas Q sugerem a desprotonação do resíduo endógeno na posição distal em função do pH, e, possivelmente, este seja responsável pelas mudanças no potencial do ponto médio ( $E_m$ ).



## REFERÊNCIAS

- [1] DUCLUZEAU, A.-L.; NITSCHKE, W. When Did Hemes Enter the Scene of Life? On the Natural History of Heme Cofactors and Heme-Containing Enzymes. In: **Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling**. [s.l.] Springer, Dordrecht, 2016. p. 13–24.
- [2] SHIMIZU, T. et al. Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 13, p. 6491–6533, 8 jul. 2015.
- [3] KEPP, K. P. **Heme: From quantum spin crossover to oxygen manager of life** **Coordination Chemistry Reviews**, ago. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854516302661>
- [4] BOWMAN, S. E. J.; BREN, K. L. The chemistry and biochemistry of heme c: Functional bases for covalent attachment. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 6, p. 1118–1130, 2008.
- [5] NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Probing heme protein-ligand interactions by UV/visible absorption spectroscopy. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 305, p. 215–242, 2005.
- [6] DOLPHIN, D. **The Porphyrins: Physical chemistry, Volume 3, Part 1**. 2. ed. Vancouver, British Columbia: Academic Press, 1978.
- [7] SCHMID, F. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. **eLS**, 19 abr. 2001.
- [8] SMAGGHE, B. J. et al. Slow ligand binding kinetics dominate ferrous hexacoordinate hemoglobin reactivities and reveal differences between plants and other species. **Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 561–570, 1 jan. 2006.
- [9] KIM, J. E.; FUKUDA, Y.; INOUE, T. Crystal structure of Kumaglobin: a hexacoordinated heme protein from an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. **FEBS Journal**, v. 286, n. 7, p. 1287–1304, 20 abr. 2019.
- [10] DUNFIELD, P. F. et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 879–882, 14 dez. 2007.
- [11] ELLEUCHE, S. et al. Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 116–123, out. 2014.
- [12] WAJCMAN, H.; KIGER, L.; MARDEN, M. C. Structure and function evolution in the superfamily of globins. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 332, n. 2–3, p. 273–282, fev. 2009.
- [13] JAMIL, F.; RAHEEL, S.; RASHEED, H. Docking of smaller ligands in the heme pocket of Hell's Gate Globin IV. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 50, n. 4, p. 1565–1568, 2018.
- [14] JAMIL, F. et al. Crystal structure of truncated haemoglobin from an extremely thermophilic and acidophilic bacterium. **Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 2, p. 97–106, 1 ago. 2014.
- [15] TEH, A. H. et al. Open and Lys-His Hexacoordinated Closed Structures of a Globin with

Swapped Proximal and Distal Sites. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11407, 22 set. 2015.

[16] TEH, A. H. et al. Hell's Gate globin I: An acid and thermostable bacterial hemoglobin resembling mammalian neuroglobin. **FEBS Letters**, v. 585, n. 20, p. 3250–3258, 20 out. 2011.

[17] KIM, T. et al. Hemoprotein-Catalyzed Cyclopropanation En Route to the Chiral Cyclopropanol Fragment of Grazoprevir. **ChemBioChem**, v. 20, n. 9, p. 1129–1132, 2 maio 2019.

[18] KAMIMURA, S. et al. The swinging movement of the distal histidine residue and the autoxidation reaction for midge larval hemoglobins. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1424–1433, abr. 2003.

[19] FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. Acetone extraction of heme from myoglobin and hemoglobin at acid pH. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 78, n. 3, p. 530–531, nov. 1963.

[20] LESLIE DUTTON, P. Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. **Methods in Enzymology**, v. 54, n. C, p. 411–435, 1978.

[21] MOORE, G. R.; PETTIGREW, G. W.; ROGERS, N. K. Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 14, p. 4998–4999, jul. 1986.

[22] MAUK, A. G.; MOORE, G. R. Control of metalloprotein redox potentials: What does site-directed mutagenesis of hemoproteins tell us? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 119–125, fev. 1997.

[23] BARRETO, G. A. et al. A spectroelectrochemical investigation of the heme-based sensor DevS from *Mycobacterium tuberculosis*: a redox versus oxygen sensor. **FEBS Journal**, v. 286, n. 21, p. 4278–4293, 11 nov. 2019.

[24] MARLETTA, M. A. et al. Structure and properties of a bis-histidyl ligated globin from *Caenorhabditis elegans*. **Biochemistry**, v. 49, n. 27, p. 5662–5670, 13 jul. 2010.

[25] HONORIO-FELÍCIO, N. et al. The Heme-Based Oxygen Sensor *Rhizobium etli* FixL: Influence of Auxiliary Ligands on Heme Redox Potential and Implications on the Enzyme Activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 164, p. 34–41, nov. 2016.

[26] ARMSTRONG, F. A. Probing metalloproteins by voltammetry. In: **Bioinorganic Chemistry**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 137–221.

[27] ZHAI, Y. et al. Recent advances in spectroelectrochemistry. **Nanoscale**, v. 10, n. 7, p. 3089–3111, 2018.

[28] FULTZ, M. LOU; DURST, R. A. Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. **Analytica Chimica Acta**, v. 140, n. 1, p. 1–18, ago. 1982.

[29] BERNHARDT, P. V.; CHEN, K. I.; SHARPE, P. C. Transition metal complexes as mediator-titrants in protein redox potentiometry. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 930–936, 26 out. 2006.

[30] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª Edição ed. [s.l: s.n.].

- [31] WINGFIELD, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In: **Current Protocols in Protein Science**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1998. p. A.3F.1-A.3F.8.
- [32] BRESOLIN, I.; MIRANDA, E.; BUENO, S. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography (IMAC) of biomolecules: Fundamental aspects and technological applications. **Química Nova**, v. 32, p. 1288–1296, 2008.
- [33] SHEEHAN, D. **Physical Biochemistry: Principles and applications**. 2nd ed. ed. Ireland: Wiley-Blackwell, 2009.
- [34] PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 3, n. 4, p. 263–281, ago. 1992.
- [35] BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A. **Methods in Enzymology - Volume 463 Guide to Protein Purification**. 2nd Editio ed. [s.l: s.n.].
- [36] DONG, S.; NIU, J.; COTTON, T. M. Ultraviolet/visible spectroelectrochemistry of redox proteins. **Methods in Enzymology**, v. 246, n. C, p. 701–732, 1995.
- [37] KING, P.; MAEDER, M. **ReactLab REDOX**, 2019. Disponível em: <https://jplusconsulting.com/products/reactlab-redox/>
- [38] BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Methods in Enzymology**, v. 326, p. 245–254, 2000.
- [39] KAKAR, S. et al. Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins. **Biophysical Chemistry**, v. 152, n. 1–3, p. 1–14, nov. 2010.
- [40] SAWAI, H. et al. Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans. **Biochemistry**, v. 42, n. 17, p. 5133–5142, 1 maio 2003.
- [41] SOUSA, E. H. S. et al. DosT and DevS are oxygen-switched kinases in Mycobacterium tuberculosis. **Protein Science**, v. 16, n. 8, p. 1708–1719, ago. 2007.
- [42] DEWILDE, S. et al. Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38949–38955, out. 2001.
- [43] DOU, Y. et al. Alteration of axial coordination by protein engineering in myoglobin. Bisimidazole ligation in the His64 → Val/Val68 → His double mutant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 27, p. 15993–16001, jul. 1995.
- [44] CORTI, P. et al. Globin X is a six-coordinate globin that reduces nitrite to nitric oxide in fish red blood cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 30, p. 8538–8543, 26 jul. 2016.
- [45] JOHNSON, E. A. et al. Lysine as a heme iron ligand: A property common to three truncated hemoglobins from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2660–2673, dez. 2018.
- [46] ROTSAERT, F. A. J. et al. Biophysical and structural analysis of a novel heme b iron ligation in the flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33224–33231, ago. 2003.
- [47] TANG, K. et al. Redox-dependent ligand switching in a sensory heme-binding GAF domain of the cyanobacterium *nostoc* sp. PCC7120. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 19067–19080, jul. 2015.

- [48] MILLER, G. T. et al. Converting a c-type to a b-type cytochrome: Met61 to his61 mutant of pseudomonas cytochrome c-551. **Biochemistry**, v. 39, n. 30, p. 9010–9017, 1 ago. 2000.
- [49] POKKULURI, P. R. et al. Structures and Solution Properties of Two Novel Periplasmic Sensor Domains with c-Type Heme from Chemotaxis Proteins of Geobacter sulfurreducens: Implications for Signal Transduction. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 5, p. 1498–1517, abr. 2008.
- [50] BATTISTUZZI, G. et al. Redox thermodynamics of the Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> couple in horseradish peroxidase and its cyanide complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 1, p. 26–27, 1 jan. 2002.
- [51] RONCEL, M. et al. Redox properties of the photosystem II cytochromes b559 and c550 in the cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 1–2, p. 206–216, jan. 2003.
- [52] KOKHAN, O.; SHINKAREV, V. P.; WRAIGHT, C. A. Binding of imidazole to the heme of cytochrome cI and inhibition of the bc1 complex from Rhodobacter sphaeroides: I. equilibrium and modeling studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22513–22521, jul. 2010.
- [53] CHEN, H.; IKEDA-SAITO, M.; SHAIK, S. Nature of the Fe-O<sub>2</sub> bonding in oxy-myoglobin: Effect of the protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 44, p. 14778–14790, 5 nov. 2008.
- [54] MARQUES, H. M.; CUKROWSKI, I.; VASHI, P. R. Co-ordination of weak field ligands by N-acetylmicroperoxidase-8 (NACMPS), a ferric haempeptide from cytochrome c, and the influence of the axial ligand on the reduction potential of complexes of NACMPS. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 8, p. 1335–1342, 2000.
- [55] COHEN, D. J.; KING, B. C.; HAWKRIDGE, F. M. Spectroelectrochemical and electrochemical determination of ligand binding and electron transfer properties of myoglobin, cyanomyoglobin, and imidazolemyoglobin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 447, n. 1–2, p. 53–62, abr. 1998.
- [56] SPIRO, T. G.; SOLDATOVA, A. V.; BALAKRISHNAN, G. CO, NO and O<sub>2</sub> as vibrational probes of heme protein interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 2, p. 511–527, jan. 2013.
- [57] SHIKAMA, K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 4, p. 1357–1373, 1 jun. 1998.
- [58] SANTOS, T. C. et al. Thermodynamic and kinetic characterization of PccH, a key protein in microbial electrosynthesis processes in Geobacter sulfurreducens. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1847, n. 10, p. 1113–1118, out. 2015.
- [59] FENG, J. J. et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. **Analytical Biochemistry**, v. 342, n. 2, p. 280–286, jul. 2005.
- [60] BRUNORI, M. et al. The transition between “acid” and “alkaline” ferric heme proteins. **BBA - Protein Structure**, v. 154, n. 2, p. 315–322, fev. 1968.
- [61] CERDA, J. F. et al. Electrochemical determination of heme-linked pK<sub>a</sub> values and the importance of using fluoride binding in heme proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 443, n. 1, p. 75–77, dez. 2013.

- [62] CAI, M.; TIMKOVICH, R. Ionization of the heme propionate substituents in pseudomonad cytochromes c-551. **FEBS Letters**, v. 311, n. 3, p. 213–216, 26 out. 1992.
- [63] TEIXEIRA, L. R. et al. Thermodynamic and kinetic properties of the outer membrane cytochrome OmcF, a key protein for extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1859, n. 10, p. 1132–1137, out. 2018.
- [64] TEIXEIRA, L. R. et al. Modulation of the Redox Potential and Electron/Proton Transfer Mechanisms in the Outer Membrane Cytochrome OmcF From *Geobacter sulfurreducens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 14 jan. 2020.
- [65] JOHNSON, E. A. et al. Characterization of THB1, a *Chlamydomonas reinhardtii* truncated hemoglobin: Linkage to nitrogen metabolism and identification of lysine as the distal heme ligand. **Biochemistry**, v. 53, n. 28, p. 4573–4589, 22 jul. 2014.
- [66] NYE, D. B. et al. Histidine-Lysine Axial Ligand Switching in a Hemoglobin: A Role for Heme Propionates. **Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 631–644, 6 fev. 2018.