



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

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS
DA GLOBINA RECOMBINANTE HELL'S GATE I (HGBI)
DO *METHYLACIDIPHILUM INFERNORUM*

FORTALEZA

2022

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS
DA GLOBINA RECOMBINANTE HELL'S GATE I (HGBI)
DO *METHYLACIDIPHILUM INFERNORUM*

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Química
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de doutor em
Química. Área de Concentração:
Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique
Silva de Sousa

FORTALEZA

2022

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)

G981e Guimarães, Wellinson Gadêlha.

Estudos espectroscópicos e cromatográficos da globina recombinante Hell's Gate I (HGbl) do *Methylobacterium inferorum* / Wellinson Gadêlha Guimarães. – 2022.
115 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

1. Hemeproteína. 2. Alterações estruturais. 3. Estado redox. 4. Biocatálise. I. Título.

CDD 540

WELLINSON GADÊLHA GUIMARÃES

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS
DA GLOBINA RECOMBINANTE HELL'S GATE I (HGBI)
DO *METHYLACIDIPHILUM INFERNORUM*

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Química
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de doutor em
Química. Área de Concentração:
Química Inorgânica.

Aprovado em: 08/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

A proteína HGbl do *Methylophilum inferorum* pertence à família das globinas, e apresenta propriedades relevantes como, resistência a autooxidação do centro metálico, estabilidade do heme em meio ácido e hexacoordenação do Fe^{2+} dependente do pH. Embora essa proteína seja conhecida e estudada há algum tempo, muitos aspectos a seu respeito ainda são desconhecidos. Nesse trabalho, se investigou os aspectos conformacionais da HGbl recombinante em condições diversas, sobretudo variando o pH e estado de oxidação/coordenação do Fe do heme. Complementarmente, foram realizados estudos exploratórios de atividades catalíticas típicas de hemoproteínas. Para isso foram utilizadas técnicas espectroscópicas como absorção eletrônica, dicroísmo circular e fluorescência; além de cromatografia de filtração em gel analítica. Os ensaios de CD indicaram que aproximadamente 90% de α -hélices formam a estrutura secundária dessa proteína. A mudança no estado redox do ferro influencia a estrutura terciária da proteína como sugerido por CD e fluorescência. A estabilidade térmica foi mensurada, sendo mais elevada na forma férrica ($T_m = 81\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,0). Adicionalmente, destaca-se a tolerância frente a solventes orgânicos, empregando-se até 30% de DMSO ou 50% metanol. Estudos cromatográficos sugerem a existência de uma estrutura quaternária da proteína quando na forma ferrosa, indicando um equilíbrio monômero-dímero, não observado na forma férrica. A interação da HGbl com cianeto e imidazol foram explorados, indicando um perfil de ligação análogo a neuroglobina. Com respeito a potencial atividade catalítica, a HGbl mostrou-se ativa quanto à catálise de reações peroxidases e dealoperoxidase, ainda que inferior ao da mioglobina. Assim, levando em consideração características de estabilidade da HGbl e os resultados catalíticos preliminares, abrem-se perspectivas para otimizações com mutações e/ou inserção de grupos prostéticos não naturais, a fim de melhorar suas propriedades enzimáticas, como vem sendo empregado em certas proteínas.

Palavras-chave: *Methylophilum inferorum*; hemoproteína; HGbl; alterações estruturais; estado redox; biocatálise.

ABSTRACT

HGbl protein from *Methylobacterium thermophilum* belongs to the globin Family, exhibiting exciting properties such as resistance to autoxidation of the metallic center, stability of heme in acidic medium and pH-dependent hexacoordination of Fe²⁺. Although this protein has been discovered for a while, many aspects about it are still unknown. Here, it was investigated conformational aspects of HGbl at different conditions, especially varying pH and Fe heme redox state/coordination. In addition, exploratory studies of typical catalytic activities of heme proteins were carried out. For these purposes, it was employed techniques such as UV-Vis electronic spectroscopy, circular dichroism, fluorescence, and also analytical gel filtration chromatography. CD assays indicate that approximately 90% of secondary structure is α -helix. Iron redox state influences tertiary structure of the protein according to CD and fluorescence studies. Thermal stability was measured, where it was higher in the ferric form ($T_m = 81^\circ\text{C}$, pH 7.0). Additionally, expressive tolerance to organic solvents is highlighted, using up to 30% of DMSO or 50% of methanol. Chromatographic studies indicate the existence of a quaternary structure in the ferrous form, suggesting a monomer-dimer equilibrium, that was not shown in the ferric form. HGbl interaction to cyanide and imidazole showed a binding profile analogous to neuroglobin. Regarding to the potential catalytic activity, HGbl was shown to be active catalyzing peroxidases and dealoperoxidase reactions, although it has been lesser than myoglobin. Thus, taking into account the robust characteristics of HGbl and preliminary catalytic results, it emerges great perspectives for HGbl optimizations with mutations and/or insertion of unnatural prosthetic groups, in order to improve its enzymatic properties, as has been done to certain proteins.

Keywords: *Methylobacterium thermophilum*; heme protein; HGbl; structural changes; redox state; biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Heme <i>b</i> (Fe(II)-protoporfirina IV).....	15
Figura 2 - Exemplos de reações catalisadas pelo citocromo P450: a) hidroxilação; b) sulfoxidação e c) epoxidação.....	17
Figura 3 - Exemplos de algumas reações catalisadas por mioglobina (nativa e mutantes). a) aminação intramolecular de uma ligação C–H; b) ciclopropanação. c) Inserção de carbeno em aminas aromáticas; d) dealogenação de halogenofenóis.....	19
Figura 4 - Produção da proteína HGbl. A) Pellet celular obtido após centrifugar cultura celular ao fim do processo de expressão. B) Fração solúvel obtida após a lise das células e centrifugação.....	38
Figura 5 - Análise da purificação da HGbl 6xHis-tag. A) imagem do gel desnaturante de poli(acrilamida) (PAGE-SDS, 12,5% poli(acrilamida)). Às amostras foi adicionado tampão contendo o redutor 2-mercaptoetanol. Poços: 1- marcador molecular de proteína (BioRad); 2- Fração solúvel (citossólica) após lise celular; 3- Precipitado com (NH ₄) ₂ SO ₄ e ressuspensão em tampão; 4- Precipitado com (NH ₄) ₂ SO ₄ , ressuspensão e após diálise; 5- Amostra eluída da coluna Ni-NTA; 6- Amostra final após diálise para remoção do imidazol e posterior concentração. B) Espectro de absorção eletrônica da HGbl 6xHis-tag ao fim da purificação, em tampão 50 mmol L ⁻¹ PBS / 100 mmol L ⁻¹ NaCl pH 7,0.....	39
Figura 6 - Ensaio Piridina-Hemocromogêneo. A) Espectros eletrônicos no UV-Vis da HGbl nas formas met e oxi após diluição de 10 vezes. B) Espectros eletrônicos no UV-Vis da HGbl nas formas met e oxi após adição do reagente piridina na presença de agente redutor (ditionito de sódio) e agente oxidante (ferricianeto de potássio). C) Relação entre a concentração de proteína e a absorção máxima da banda Soret.....	41
Figura 7 - Espectros de massa da HGbl-Fe ³⁺ (met). A) e B) Espectro massa-carga (m/z) e espectro de massas em solução 50/50 acetonitrila/água (0,2% ácido fórmico). C) e D) Espectro massa-carga (m/z) e espectro de massas em água.....	43
Figura 8 - Espectros de dicroísmo circular da HGbl nas formas Fe ³⁺ (met) e Fe ²⁺ -O ₂ (oxi) na região do ultravioleta distante, proteína na concentração de 2 μmol L ⁻¹ em solução 10 mmol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 5,5 e 7,0 a 25 °C.....	46
Figura 9 - Diferenças espectroscópicas entre a HGbl nas formas Fe ³⁺ (met) e Fe ²⁺ -O ₂ (oxi). A) Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo. B) Espectros de dicroísmo circular na região da banda Soret. C) Espectros de emissão de fluorescência com excitação em 280 nm. D) Espectros de emissão de fluorescência com excitação em 295 nm.....	49

Figura 10 -	Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl-Fe ³⁺ (met), proteína na concentração de 5 μmol L ⁻¹ em solução 100 mmol L ⁻¹ NaCl a 25 °C durante titulação (pH 12,0 – 3,3). A) Espectros na faixa de comprimento de onda de 310 a 700 nm. B) Espectros na faixa de comprimento de onda de 250 a 310 nm. C) Variação do comprimento de onda máximo da banda Soret. D) Variação do comprimento de onda máximo da banda referente às transições eletrônicas dos resíduos de aminoácidos aromáticos (~280 nm)...	51
Figura 11 -	Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl-Fe ³⁺ (met) em diferentes concentrações de solventes orgânicos – dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) – juntamente com tampão 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4. Concentração da proteína igual a 5 μmol L ⁻¹	52
Figura 12 -	Desnaturação térmica da HGbl-Fe ³⁺ (met) por dicroísmo circular. Cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 2 μmol L ⁻¹ em solução 10 mmol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ . A) e B) são espectros de dicroísmo circular da HGbl-Fe ³⁺ (met) na região do espectro entre 185 e 255 nm, coletados a cada 10°C de variação de temperatura, nos pH de 5,5 e 7,0, respectivamente. C) Perfis de desnaturação de 5 a 95 °C acompanhado por dicroísmo circular a 222 nm com elipticidades coletadas a cada 2 °C.....	53
Figura 13 -	Desnaturação térmica da HGbl nas formas Fe ²⁺ -O ₂ (oxi) e Fe ³⁺ (met). Espectros de Dicroísmo Circular nas temperaturas de 65, 75 e 85°C em pHs 7,0 e 5,0. Cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 2 μmol L ⁻¹ em solução 10 mmol L ⁻¹ PBS.	55
Figura 14 -	Desnaturação térmica da HGbl nas formas Fe ³⁺ (met) e Fe ²⁺ -O ₂ (oxi). Espectros de Dicroísmo Circular na faixa de 300 a 500 nm. Variação de temperatura de 5 a 95°C, a 1°C min ⁻¹ . Cubeta com caminho ótico de 1 cm. Proteína na concentração de 20 μmol L ⁻¹ em tampão 100 mmol L ⁻¹ PBS, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4.....	56
Figura 15 -	Desnaturação térmica da HGbl nas formas Fe ³⁺ (met) e Fe ²⁺ -O ₂ (oxi). Espectros de Emissão de Florescência na faixa de 290 a 420 nm, com excitação em 280 nm. Variação de temperatura de 20 a 85°C, a 1°C min ⁻¹ . Cubeta com caminho ótico de 1 cm. Proteína na concentração de 2 μmol L ⁻¹ em tampão 100 mmol L ⁻¹ PBS, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4.....	57
Figura 16 -	Espectros eletrônicos na região do UV-Vis da proteína HGbl, obtidos em diferentes tempos durante a incubação com 10% Tween20 a 37°C. A variação da absorbância da banda Soret com o tempo é mostrada no detalhe.....	60
Figura 17 -	Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl em suas formas apo e holo.....	61

Figura 18 - Espectros da HGbI em suas formas apo e holo. A) dicroísmo circular na região do ultravioleta distante, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. B) dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. C) fluorescência com excitação em 280 nm, 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. Tampão 10 mmol L^{-1} fosfato pH 7,0.....	62
Figura 19 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da apo HGbI antes e após incubação com hemina.....	64
Figura 20 - Cromatogramas da HGbI nas formas met (Fe^{3+}), oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) e CO ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$) com acompanhamento em 412 nm. [HGbI] = 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fluxo de 0,8 mL min^{-1} . Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,0. Inset: comparação entre formas desoxi (Fe^{2+}) e met.....	66
Figura 21 - Cromatogramas deconvoluídos da HGbI oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) e ligada a CO ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$) em pH 7,0.....	66
Figura 22 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes as amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 21.....	67
Figura 23 - Curva de calibração com diferentes proteínas na filtração em gel. Fluxo de 0,8 mL min^{-1} . Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4. 1- ReFixL, 2- BSA, 3- Ovoalbumina, 4- Mioglobina e 5- Citocromo c. Inset: cromatogramas da HGbI met e oxi.....	68
Figura 24 - Cromatogramas da HGbI nas formas met (Fe^{3+}) e oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) em diferentes pH. [HGbI] = 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fluxo de 0,8 mL min^{-1} . Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl.....	69
Figura 25 - Cromatogramas deconvoluídos da HGbI oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) em diferentes pH.....	69
Figura 26 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes às amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 24.....	70
Figura 27 - Cromatogramas da HGbI nas formas met (A) e oxi (B) em diferentes concentrações (0,5 – 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fluxo de 0,8 mL min^{-1} . Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4.....	71
Figura 28 - Cromatogramas deconvoluídos da HGbI oxi em diferentes concentrações. Percentual das duas formas oligoméricas calculados a partir das áreas dos picos resultantes das deconvoluções: monômero (vermelho) e dímero (azul).....	72
Figura 29 - Reações de crosslink com HGbI nas formas met (Fe^{3+}) e oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$). Reagentes utilizados: cloreto de tris(bipiridina) de rutênio II ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$), succinimidil maleimidometil cicloexano carboxilato (SMCC) e dissuccinimidil suberato (DSS). Cromatogramas referentes a filtração em gel das amostras após reações de crosslink. Comprimento de onda acompanhado: 412 nm. Fluxo de 0,8 mL min^{-1} . Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl.....	73
Figura 30 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes as amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 29.....	74
Figura 31 - Homodímero da HGbI com alguns aminoácidos em destaque. Subunidade 1: cisteína-98. Subunidade 2: asparinas-20, 22 e 31 e lisinas-21 e -34.....	75

Figura 32 - Monitoramento da reação da HGbI com o íon cianeto. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbI-Fe ³⁺ (met) após incubação com KCN a 25°C. [HGbI] = 5 µmol L ⁻¹ ; [KCN] = 5 mmol L ⁻¹ , em soluções 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 5,5 e 7,4. Variação do máximo da Soret em função do tempo.....	76
Figura 33 - Curvas de <i>k</i> _{obs} versus concentração de cianeto. Os ensaios cinéticos foram realizados a 25°C em solução 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl.....	78
Figura 34 - Valores de <i>K</i> _D da ligação de CN ⁻ a HGbI-Fe ³⁺ em diferentes temperaturas. As cinéticas foram realizadas em solução 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 5,5.....	80
Figura 35 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis da met-HGbI (Fe ³⁺) antes e durante reação com imidazol. [HGbI] = 8 µmol L ⁻¹ , [imidazol] = 2 mmol L ⁻¹ . Tampão 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4 (25 °C). Inset: variação da absorbância da banda Soret em função do tempo de reação com imidazol.....	81
Figura 36 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis da HGbI-Fe ³⁺ (met) em pH 5,5 e 7,4, antes e após reação com imidazol. [HGbI] = 5 µmol L ⁻¹ , [imidazol] = 240 mmol L ⁻¹ . Solução 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl (25 °C).....	83
Figura 37 - Espectros de dicroísmo circular da HGbI-Fe ³⁺ (met) antes e após incubação com imidazol. [HGbI] = 20 µmol L ⁻¹ , [imidazol] = 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L ⁻¹ . Solução 100 mmol L ⁻¹ fosfato, 100 mmol L ⁻¹ NaCl, 25 °C. A) Espectros de CD na região da banda Soret, pH 5,5. B) Espectros de CD na região da banda Soret, pH 7,4. C) Espectros de CD na região do ultravioleta próximo, pH 5,5. D) Espectros de CD na região do ultravioleta próximo, pH 7,4.....	83
Figura 38 - Representação do mecanismo de oxidação de um substrato por uma enzima peroxidase.....	85
Figura 39 - Atividade peroxidase da HGbI empregando OPD como substrato. A) espectros eletrônicos coletados ao longo do tempo; B) monitoramento da variação da absorbância em 415 nm no tempo (círculos vermelhos cheios). Círculos pretos abertos são referentes ao controle feito sem a proteína. Concentrações usadas: 0,5 µmol L ⁻¹ de HGbI; 3,5 mmol L ⁻¹ de OPD e 3,0 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ , em tampão 50 mmol L ⁻¹ PBS, 150 mmol L ⁻¹ NaCl pH 7,2; a 25°C.	87
Figura 40 - Atividade peroxidase da Mb e da HGbI empregando OPD como substrato. Concentrações: 0,1 µmol L ⁻¹ de proteína; 3,14 mmol L ⁻¹ de OPD e 0,04 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ , em tampão 50 mmol L ⁻¹ PBS, 150 mmol L ⁻¹ NaCl pH 7,2; a 25°C.....	88

Figura 41 -	Atividade peroxidase da Mb e da HgbI empregando OPD como substrato. Concentrações: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 3,14 mmol L^{-1} de OPD e 2,7 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} citrato, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 5,0; a 25°C.....	88
Figura 42 -	Atividade peroxidase da HgbI e da Mb empregando guaiacol como substrato orgânico. Concentrações empregadas: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 2 mmol L^{-1} de Guaiacol e 2 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS / 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,0; a 25 °C. A) Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para a reação do guaiacol e H_2O_2 na presença de HgbI; B) Variação da absorbância em 480 nm observada em (A) em função do tempo. C) Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para a reação do guaiacol e H_2O_2 na presença da Mb; D) Variação da absorbância em 480 nm observada em (C) em função do tempo.....	91
Figura 43 -	Representação dos sítios hêmicos sobrepostos da HgbI (lilás) e da mioglobina mutante F43W (amarelo) com alguns aminoácidos em destaque. As estruturas foram construídas através dos dados disponíveis no Protein Data Bank (PDB_3S1J e PDB_1VXA). O software Chimera foi utilizado para sobreposição.....	92
Figura 44 -	Atividade dealoperoxidase da HgbI (A) e da Mb (B) empregando 2,4,6-triclorofenol (TCP) como substrato. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis. Concentrações: 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 0,1 mmol L^{-1} de TCP e 0,5 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,0 e a 25°C.....	93
Figura 45 -	Atividade dealoperoxidase da HgbI (A) e da Mb (B) empregando 2,4,6-triclorofenol (TCP) como substrato. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis. Concentrações: 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 0,1 mmol L^{-1} de TCP e 0,5 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 5,5 e a 25°C.....	94
Figura 46 -	Representação dos sítios hêmicos sobrepostos da HgbI (lilás) e da mioglobina mutante F43Y/H64D (azul) com alguns aminoácidos em destaque. As estruturas foram construídas através dos dados disponíveis no Protein Data Bank (PDB_3S1J e PDB_1VXA). O software Chimera foi utilizado para sobreposição.....	95
Figura 47 -	Representação esquemática da redução do nitrito catalisada por heme enzima.....	96
Figura 48 -	Espectros eletrônicos no UV-Vis das proteínas HgbI e Mb reduzidas e em presença de NO_2^- . A) HgbI + NaNO_2 ; B) Mb + NaNO_2 ; a concentração das proteínas foi 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 10 mmol L^{-1} , 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,2; 2,5 mmol L^{-1} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 1 mmol L^{-1} NaNO_2	97
Figura 49 -	Espectros eletrônicos no UV-Vis da HgbI- Fe^{2+} após ser incubada com liberador de NO (dietilamina NONOato de sódio) e após adição de ditonito de sódio (DTH).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do gel usado na eletroforese SDS-PAGE.....	28
Tabela 2 - Tampões utilizados e seus respectivos pHs.....	33
Tabela 3 - Comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) relativos às bandas Soret e Q de hemeproteínas no estado oxidado Fe^{3+}	42
Tabela 4 - Estruturas secundárias presentes na HgbI determinadas utilizando os softwares Contin-LL e BestSel a partir da análise do espectro de dicroísmo circular.....	47
Tabela 5 - Valores de k_{on} , k_{off} e KD para a reação do CN^- com a HgbI- Fe^{3+} em diferentes pH. As cinéticas foram realizadas a 25°C em solução 100 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl.....	78
Tabela 6 - Constantes cinéticas de associação e dissociação de CN^- a HgbI- Fe^{3+} em diferentes temperaturas. As cinéticas foram realizadas em solução 100 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 5,5.....	80
Tabela 7 - Substratos e produtos nos ensaios de peroxidase.....	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Heme proteínas	14
1.2 Mioglobina (Mb)	17
1.3 Neuroglobinas (Ngb)	20
1.4 Hell's Gate globin I (HGbl)	20
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Genes	24
3.2 Crescimento celular e expressão proteica	24
3.3 Purificação	25
<u>3.3.1 Lise das células</u>	25
<u>3.3.2 Precipitação da fração proteica contendo HGbl</u>	26
<u>3.3.3 Purificação em coluna Níquel-NTA Agarose</u>	26
3.4 Ensaio Piridina-Hemocromogênio	28
3.5 Dicroísmo Circular	29
<u>3.5.1 Estabilidade térmica</u>	30
<u>3.5.2 Predição da estrutura secundária</u>	30
3.6 Fluorescência Intrínseca	31
3.7 Espectrometria de Massas	31
3.8 Avaliação da Estabilidade da HGbl em diferentes valores de pH	31
3.9 Remoção do Grupo Heme	32
3.10 Ensaio de Atividade Peroxidase	33
<u>3.10.1 Atividade peroxidase empregando o-fenilenodiamina (OPD)</u>	34
<u>3.10.2 Atividade peroxidase empregando Guaiacol</u>	34
<u>3.10.3 Desaloperoxidase do 2,4,6-triclorofenol (TCP)</u>	34
3.11 Atividade Nitrito-Redutase	34
3.12 Cromatografia de Filtração em Gel	35
3.13 Reações de cross-linking	35
3.14 Ligação do cianeto a HGbl	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Purificação da Proteína HGbl Recombinate (Hell's Gate globin I)	37

4.2 Determinação do Coeficiente de Extinção Molar (ϵ)	39
4.3 Massa intacta da HGbI	42
4.4 Estrutura secundária da proteína HGbI	44
4.5 Diferenças Espectroscópicas entre as Formas Met e Oxi da HGbI	
Recombinante	47
4.6 Estabilidade da HGbI	48
<u>4.6.1 Estabilidade em diferentes valores de pH</u>	49
<u>4.6.2 Estabilidade em solventes orgânicos</u>	50
<u>4.6.3 Estabilidade térmica</u>	52
4.7 Remoção do grupo Heme	58
<u>4.7.1 Reinserção do grupo heme</u>	63
4.8 Oligomerização versus Estado de oxidação	64
4.9 Associação da HGbI ao íon cianeto (CN⁻) e imidazol	74
<u>4.9.1 Afinidade da met-HGbI por CN⁻</u>	74
<u>4.9.2 Interação do imidazol com met-HGbI</u>	80
4.10 Investigação de processos biocatalíticos	83
<u>4.10.1 Atividade Peroxidase</u>	83
<i>4.10.1.1 Atividade Peroxidase com o Substrato o-Fenilenodiamina (OPD)</i>	85
<i>4.10.1.2 Atividade Peroxidase com o Substrato Guaiacol</i>	89
<i>4.10.1.3 Atividade Peroxidase com o Substrato 2,4,6-triclorofenol (TCP)</i>	92
<u>4.10.2 Atividade Nitrito Redutase</u>	95
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A - ESPECTROS DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA	
COMPLEMENTARES	111
ANEXO B - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	
(AUTOR PRINCIPAL OU COLABORADOR)	114

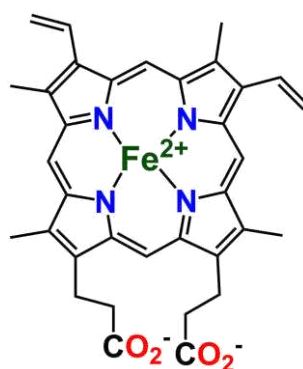
1. INTRODUÇÃO

1.1. Heme proteínas

Ácidos nucleicos e proteínas, além de alguns tipos de carboidratos e lipídeos, formam substâncias conhecidas como macromoléculas biológicas. Embora todas sejam essenciais às formas de vida, são as proteínas as mais abundantes provavelmente as mais complexas no que diz respeito a funcionalidade e estrutura (NELSON; COX, 2004).

A natureza desempenha uma pluralidade de atividades utilizando o grupo heme ancorado nas mais diversas estruturas protéicas. Esse composto é caracterizado por um macrociclo composto por quatro anéis pirrólicos ligados por seus nitrogênios a um íon ferro (II ou III) no centro da estrutura. Embora existam algumas variações no macrociclo, o tipo mais comumente encontrado em proteínas é o heme *b*, que apresenta grupamentos metila, vinila e propionatos ligados aos anéis pirrólicos, sendo que esse macrociclo não se liga covalentemente com a cadeia polipeptídica (REEDY; GIBNEY, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Heme *b* (Fe(II)-protoporfirina IV).



Fonte: o autor.

O estado do íon ferro é variável quanto à oxidação e coordenação, podendo se apresentar nas formas Fe(II) ou Fe(III), bem como penta- ou hexacordenado. As posições axiais desse sistema são ocupadas por pelo menos um resíduo de aminoácido da cadeia proteica sendo usado pares de elétrons isolados para coordenação ao ferro (ex. *N*-histidina, *O*-tirosina, *S*-cisteína, dentre outros). O segundo sítio axial de coordenação ao ferro pode ser ocupado por pequenas moléculas como O₂, CO, NO ou H₂O ligadas reversivelmente. Certas proteínas

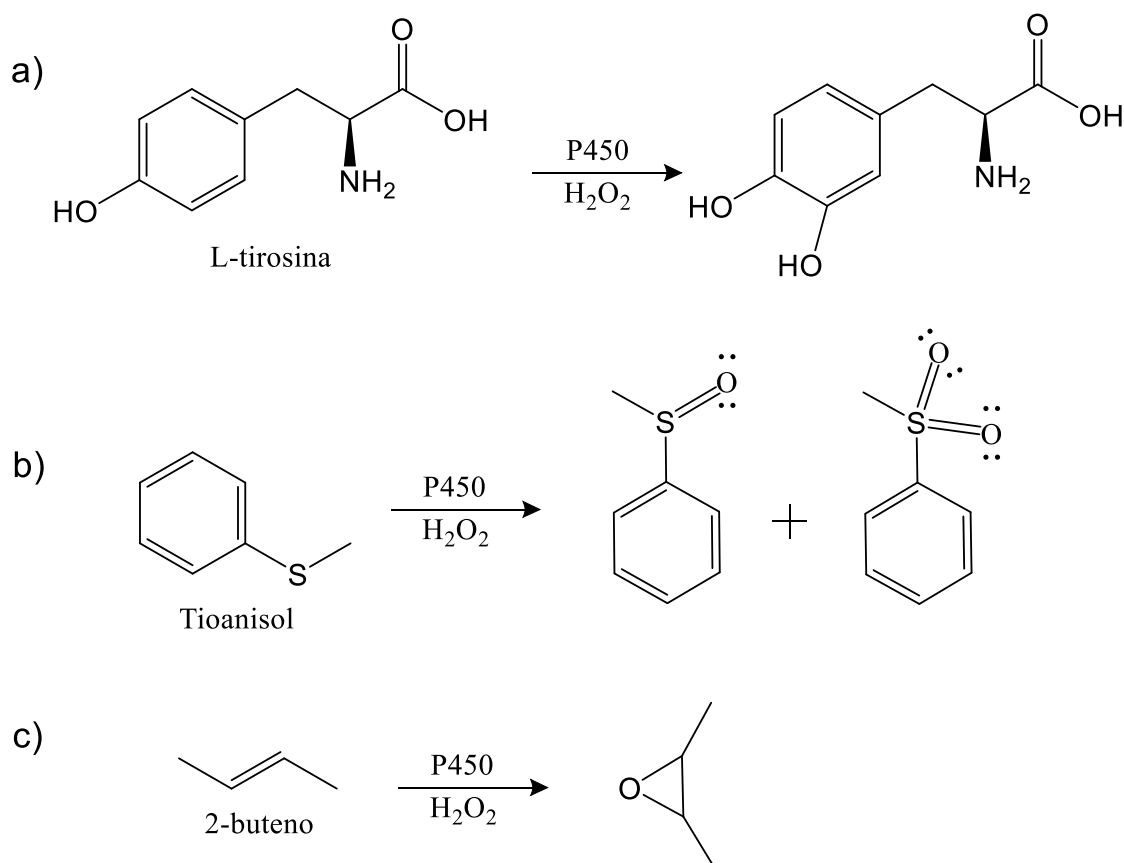
possuem o ferro do heme ligado axialmente por dois resíduos de aminoácidos da cadeia proteica, como as neuroglobinas, que na forma Fe^{2+} encontram-se duplamente ligada por histidinas, na ausência de um ligante externo (KIGER *et al.*, 2004).

A reversibilidade da ligação às moléculas axiais é um fator muito importante. Proteínas sensoras de oxigênio, por exemplo, dependem da associação/dissociação deste ligante para desencadear respostas reversíveis do organismo à variações na concentração do oxigênio. Outro fator crucial diz respeito ao estado de oxidação do centro metálico. Ligantes como O_2 e CO ligam-se exclusivamente ao estado ferroso ($Fe(II)$), enquanto que H_2O liga-se apenas à forma férrica ($Fe(III)$). O óxido nítrico (NO) é um exemplo de molécula que se liga ao heme nos dois estados de oxidação, apesar de que tenha larga preferência pela forma reduzida de $Fe(II)$. Muitas proteínas hémicas têm funções que dependem do par redox Fe^{3+}/Fe^{2+} , seja por modificações conformacionais (sensoras redox), seja pelo envolvimento direto em processos oxirredutivos, como acontece em muitos processos catalíticos (peroxidases, catalases).

As reações de hidroxilação, sulfoxidação e epoxidação são exemplos de monooxigenações catalisadas pelos citocromos P450 (Figura 2). Adicionalmente, a oxidação de substratos como aminas e fenóis, em processos monoeletrônicos são catalisadas por peroxidases. Ao passo que catalases aceleram a reação de desproporcionamento do H_2O_2 em oxigênio e água. Esses são alguns dos exemplos de reações de oxidação e oxigenação catalisadas por enzimas contendo o grupo prostético heme(WATANABE, 2002).

A partir dessa gama de reações catalisadas por enzimas hémicas, os cientistas veem desenvolvendo, através de *evolução direta* ou incorporações de grupos prostéticos não-naturais, enzimas capazes de realizar reações até então possíveis apenas por métodos químicos convencionais. Essas reações, muitas vezes, requerem altas temperaturas e pressão, e uso de solventes orgânicos nocivos ao meio ambiente. O termo evolução direta refere-se a engenharia de proteínas que visa criar “novas” proteínas por meio de mutações específicas e seleção daqueles mutantes com as características desejadas a fim de alcançar melhores atividades catalíticas(JESCHEK; PANKE; WARD, 2018; SCHWIZER *et al.*, 2018; WIESZCZYCKA; STASZAK, 2017).

Figura 2 - Exemplos de reações catalisadas pelo citocromo P450: a) hidroxilação; b) sulfoxidação e c) epoxidação.



Fonte: adaptado de CONNOR (2011); KATO (2002) e VAZ (2002).

Arnold e colaboradores têm trabalhado buscando ampliar as possibilidades catalíticas do citocromo P450, envolvendo reações que não eram, até então, realizadas biologicamente. Curiosamente, após a substituição do aminoácido na posição 268, treonina (Thr) substituída por alanina (Ala), os pesquisadores conseguiram obter um mutante do citocromo P450 capaz de realizar ciclopropanações de olefinas utilizando diazoésteres como fonte de carbenos, processo esse jamais descrito para uma enzima (COELHO *et al.*, 2012). Em trabalhos posteriores, o citocromo P450 foi investigado na produção catalítica de aziridinas e de amino álcoois a partir de estireno e derivados. Em ambas as reações foram alcançados elevados números de produto, formado por cada molécula de enzima (*turnover*), e altos níveis de enantiosseletividade (CHO *et al.*, 2019; FARWELL *et al.*, 2015). Esses trabalhos, bem como o de outros grupos, vem despertando intenso interesse no desenvolvimento de novos

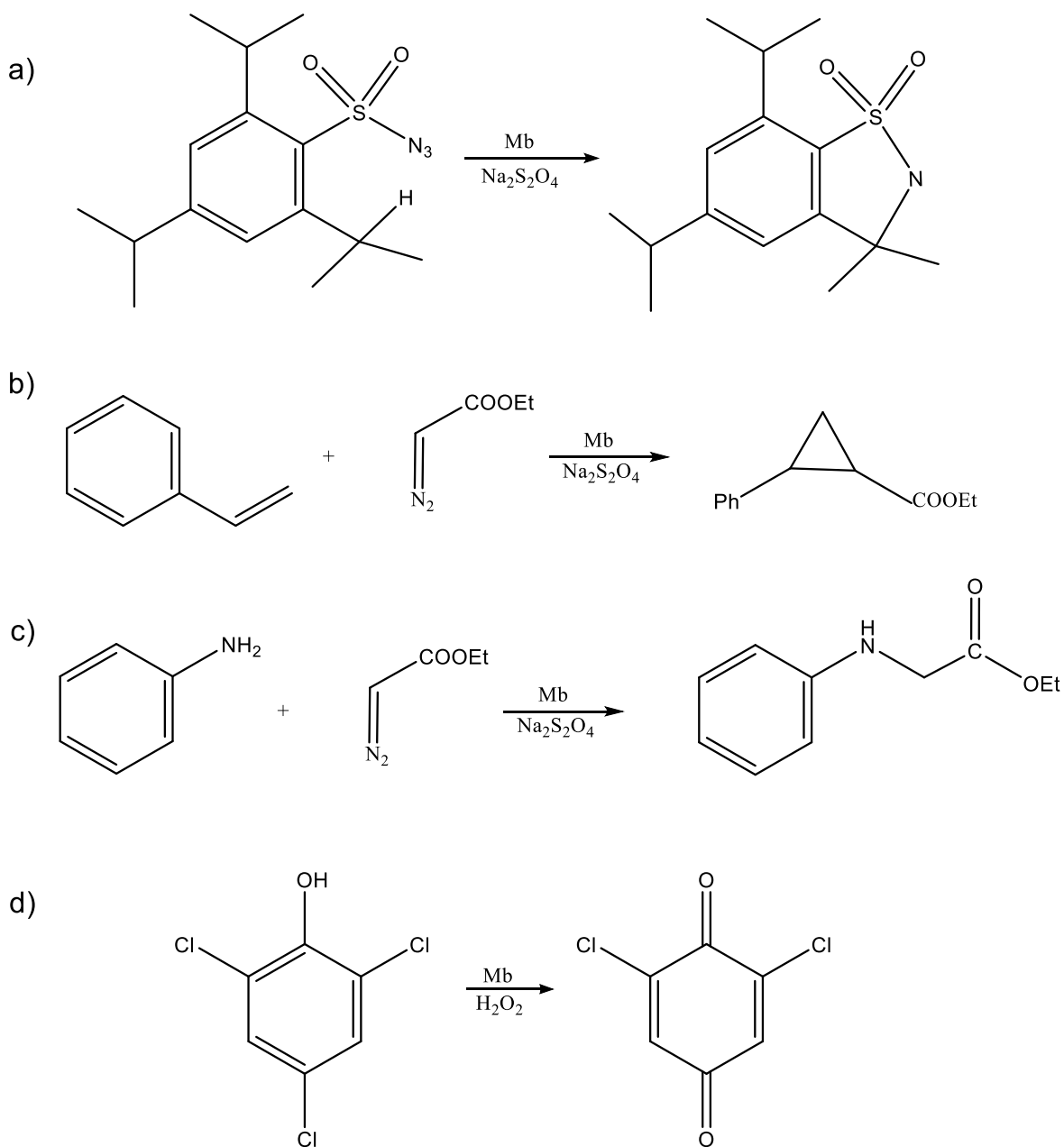
biocatalisadores, sendo diversas proteínas investigadas como novas plataformas catalíticas.

1.2. Mioglobina (Mb)

O grupo heme tem sido observado associado a diversos domínios proteicos, sendo o domínio globina considerado um dos mais extensos, tendo como importantes exemplos a hemoglobina, mioglobina, neuroglobina dentre outros. A mioglobina (Mb) é uma heme proteína citoplasmática que consiste de uma única cadeia de cerca de 154 aminoácidos. Sua estrutura foi primeiramente descrita há aproximadamente 60 anos, sendo que em trabalhos posteriores já havia sido descoberto que era quase inteiramente formada por α -hélices. Assim como a hemoglobina, a mioglobina se liga reversivelmente ao O_2 , facilitando o transporte de oxigênio das células vermelhas do sangue para as mitocôndrias, durante períodos de intensa atividade metabólica; ou agindo como reservatórios de O_2 durante condições de hipóxia (ORDWAY; GARRY, 2004).

Fasan e colaboradores mostraram que a mioglobina é capaz de realizar uma reação de aminação intramolecular em azidas arilssulfonilas (Figura 3-a), quando em ambiente anaeróbico e na presença de um agente redutor ($Na_2S_2O_4$, ditionito de sódio) (BORDEAUX; SINGH; FASAN, 2014). Esse foi o primeiro trabalho publicado mostrando que a Mb poderia ser empregada como um biocatalisador. Os autores realizaram ensaios com algumas heme proteínas, dentre as quais a Mb, e adicionalmente com alguns de seus mutantes. Como esperado, mutações em resíduos próximos ao grupo heme acarretaram alterações na atividade catalítica da proteína. Desta forma quando a histidina distal foi substituída por uma valina (H64V) observou-se um aumento no número de *turnovers* realizados pela proteína na reação de aminação, ao passo que uma mutação adicional gerando o mutante duplo H64V-V68A-Mb ocasionou uma diminuição no número de *turnovers*, mas aumentou consideravelmente sua enantiosseletividade (BORDEAUX; SINGH; FASAN, 2014).

Figura 3 - Exemplos de algumas reações catalisadas por mioglobina (nativa e mutantes). a) aminação intramolecular de uma ligação C–H; b) ciclopropanação. c) Inserção de carbeno em aminas aromáticas; d) dealogenação de halogenofenóis.



Fonte: Bordeaux (2012); Bordeaux (2015); Sreenilayam (2015); Liao (2016).

Em um trabalho posterior, Fasan e colaboradores exploraram novamente a Mb como potencial catalisador de reações de ciclopropanação de olefinas (Figura 3-b) (BORDEAUX; TYAGI; FASAN, 2015). Uma comparação entre o grupo heme livre e a Mb nessa reação mostra a importância da estrutura da proteína para que a reação se processe. Através de mutações, os pesquisadores conseguiram obter uma proteína

com alta eficiência catalítica (até 92% de conversão do substrato e *turnover* > 12.000) aliada a alta seletividade quanto ao diastereoisômero e ao enantiômero. Adicionalmente, os autores propuseram um mecanismo para a ciclopropanação catalisada pela Mb, em que o diazoéster ataca inicialmente o Fe, com posterior liberação de N₂ e formação do carbânion, que irá reagir com o substrato ainda ligado ao grupo heme (BORDEAUX; TYAGI; FASAN, 2015). Em um artigo mais recente, Fasan e Sreenilayam fizeram uma reação análoga em que diazoacetato é adicionado a amins aromáticas, especificamente às suas ligações N–H (Figura 3-c)(SREENILAYAM; FASAN, 2015), ampliando o arsenal de reações catalisadas pela mioglobina.

As reações citadas até aqui são catalisadas pela mioglobina reduzida, isto é, com heme Fe²⁺. Contudo, a proteína também está envolvida em processos catalíticos em sua forma oxidada, Fe³⁺. A atividade peroxidase promovida por enzimas hémicas depende da presença de H₂O₂, e não requer ambiente redutor e/ou anaeróbico (FORNERA; WALDE, 2010a). A mioglobina teve sua atividade peroxidase sob o 1,4-fenilenodiamina avaliada em água e em alguns solventes orgânicos, convertendo esse substrato em 2,3-diaminofenazina. Nesse estudo foi mostrado que a Mb apresenta maior *turnover* quando a reação ocorre em água, contudo é observado uma maior velocidade inicial em metanol (LONG *et al.*, 2016).

Fenóis halogenados, comumente usados em pesticidas, causam danos graves ao meio ambiente. Assim, sua conversão a produtos menos nocivos tem sido alvo de diversos estudos, sendo que os métodos biológicos têm recebido atenção especial recentemente. O mutante da mioglobina F43Y-Mb teve sua atividade dealoperoxidase (DHP) testada devido sua similaridade com a proteína nativa DHP do *Amphitrite ornata*, a qual realiza degradação de fenóis halogenados (Figura 3-d). Curiosamente, foi demonstrado que esse mutante de Mb tem elevada atividade desaloperoxidase, superando inclusive a DHP de *A. ornata* (LIAO *et al.*, 2016).

Para além das mutações, novos biocatalisadores têm sido desenhados a partir da incorporação de novos grupos prostéticos, geralmente derivados do grupo heme, na estrutura da mioglobina. Uma Mb reconstituída com Ir-porfirina IX foi usada eficientemente na catálise de reações que envolvem a formação de ligações C–C tanto intermoleculares quanto intramoleculares (WARD, 2016). Outro curioso exemplo

seria o de uma Mb reconstituída com uma porfirina de rutênio, utilizada com sucesso em catálises de ciclopropanações e aminações (WOLF; VARGAS; LEHNERT, 2017).

1.3. Neuroglobinas (Ngb)

Dentro da superfamília das globinas, as neuroglobinas (Ngb) ocupam um espaço relativamente recente, tendo sido descobertas em 2000 em tecidos neuronais de roedores e humanos (BURMESTER *et al.*, 2000), enquanto a primeira estrutura resolvida da Mb foi publicada em 1958 (KENDREW *et al.*, 1958). Sua estrutura organiza-se em 8 α -hélices que formam um monômero, em semelhança à mioglobina. Entretanto o ferro do heme apresenta-se hexacoordenado a duas histidinas, na ausência de ligantes externos, tanto na forma ferrosa quanto na férrica (ASCENZI *et al.*, 2016; HANKELN; BURMESTER, 2008). Assim, a ligação de moléculas gasosas, como O₂ e CO, envolve uma etapa de dissociação do ligante interno.

Outra característica peculiar foi a termorresistência considerável apresentada pela Ngb humana, com uma temperatura de desnaturação próxima a 100 °C e resguardando funcionalidade mesmo a 90 °C (HAMDANE *et al.*, 2005). Um estudo sobre a associação de neuroglobinas a ligantes típicos do grupo heme, mostrou que sua afinidade por cianeto (CN⁻) é bastante inferior a observada para Mb, cerca de 45 vezes menor, o que foi atribuído a alta afinidade de resíduo interno de histidina ao ferro oxidado (Fe³⁺) do heme (KIGER *et al.*, 2004), (HAMDANE *et al.*, 2005).

A função definitiva das Ngb nos organismos onde são encontradas ainda não foi descoberta. Nessa busca, uma das possibilidades exploradas foi a atividade de nitrito redutase, em que a proteína mostrou-se com taxas de conversão de nitrito a NO da mesma ordem da Mb e Hb (PETERSEN; DEWILDE; FAGO, 2008). A capacidade neuroprotetora da Ngb contra estresse oxidativo já foi demonstrada, e relacionada a mudanças na estrutura terciária da proteína quando seu centro metálico vai de Fe(II) para Fe(III) (WATANABE *et al.*, 2012), abrindo perspectivas para que a proteína funcione como sensora redox.

1.4. Hell's Gate globin I (HGbl)

O microrganismo *Methylococcus thermophilus* ocorre naturalmente na Nova Zelândia, em uma região chamada "Hell's gate" (Tikitere). Trata-se de uma bactéria aeróbica e um metanotrófico obrigatório, que cresce em fendas geotermas e solo

ácido, onde encontra condições ótimas de temperatura e acidez (60 °C e pH 2,0) (DUNFIELD *et al.*, 2007).

No genoma do *M. inferorum* foram identificadas 5 proteínas globinas, dentre as quais, a *Hell's Gate globin I* (HGbl). As demais são *Hell's Gate globin II, III, IV e RL*. As globinas compõem uma superfamília de proteínas globulares relativamente pequenas, tendo em média 150 aminoácidos. Normalmente são formadas por 8 α -hélices que se organizam numa estrutura de “sanduíche” bastante característica (BOLOGNESI *et al.*, 1997; KENDREW, 1963). Possuem um grupo prostético heme capaz de se ligar a moléculas pequenas, como CO, NO e O₂, podendo funcionar no transporte e armazenamento desses gases, assim como fazem a hemoglobina e a mioglobina com oxigênio (DICKERSON; BENJAMIN, 1984; WITTENBERG; WITTENBERG, 2003), além de outras funções de sensor e catalíticas.

A HGbl possui 133 aminoácidos, massa molecular de 15,9 KDa, originando um único domínio (HOU *et al.*, 2008; TEH *et al.*, 2011). Sua estrutura é composta por sete α -hélices, com a hélice D ausente, e apesar disso a proteína assume o arranjo clássico de “sanduíche 3/3”. Estruturalmente a HGbl assemelha-se a neuroglobinas (TEH *et al.*, 2011). Os cristais obtidos para a proteína indicam três subunidades idênticas na unidade assimétrica. Além disso, observa-se que duas subunidades relacionadas por eixos não-cristalográficos formam um dímero (PECHKOVA *et al.*, 2012). Seu espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis é bastante semelhante ao das hemoglobinas. Contudo, algumas características atípicas foram observadas em relação a outras globinas; em especial a alta estabilidade da forma ferrosa quanto a autoxidação e o fato do grupo heme não ser removido após incubação em soluções ácidas por longos períodos. Além disso, o pH aparentemente influencia na coordenação do grupo heme em sua forma reduzida, que passa de pentacoordenado, em pHs menores que 4,6; para hexacoordenado quando o pH aumenta (TEH *et al.*, 2011).

Considerando sua similaridade com a mioglobina, que recentemente tem recebido atenção quanto às suas potencialidades catalíticas, é possível que a HGbl atue como uma enzima em alguma reação naturalmente no microrganismo ou *in vitro*. Aliando isso às características de estabilidade a temperatura e pH, a proteína poderia vir a ser empregada como um biocatalisador, trabalhando em condições que favoreceriam certas reações, cujas condições seriam inviáveis para outras enzimas.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A heme proteína *Hell's gate globin I* (HGbl) do microrganismo *Methyacidiphilum inferorum* foi estudada pela primeira vez em 2001 tendo havido poucas publicações nos últimos anos. A sua possível função biológica tem sido especulada, mas praticamente descarta-se seu papel como transportadora de O₂ ou mesmo de uma heme proteína sensora de O₂ ou CO (TEH *et al.*, 2011). A importância de elucidar processos biológicos e bioquímicos é notória, e muitas vezes passa pelo entendimento do funcionamento básico das proteínas. Diversos esforços são feitos nesse sentido, desde identificar resíduos funcionais, avaliar alterações conformacionais até entender como a proteína se arranja tridimensionalmente. Na busca de melhor compreender as propriedades da HGbl, surge a possibilidade de que atue como biocatalisador, abrindo inclusive a perspectiva de seu uso como biocatalisador para reação biológicas e não biológicas.

Desta forma, esse trabalho tem por objetivo geral, investigar as propriedades conformacionais e catalíticas da HGbl recombinante. Nossos objetivos específicos são:

1. Obter a proteína HGbl recombinante;
2. Investigar mudanças conformacionais globais na proteína e no microambiente que circunda o grupo prostético mediante alterações no pH do meio e no estado de oxidação heme;
3. Investigar mudanças conformacionais decorrentes de alterações no pH do meio e no estado de oxidação do grupo heme;
4. Avaliar a estabilidade térmica da HGbl recombinante;
5. Investigar a interação de cianeto e imidazol com a proteína;
6. Investigar estratégias de remoção do grupo heme e inserção de novo grupo prostético;
7. Investigar a atividade catalítica da HGbl recombinante na reação de peroxidase empregando como substratos: *o*-fenilenodiamina e guaicol;
8. Investigar a atividade catalítica da HGbl na reação de desaloperoxidase empregando como substrato o 2,4,6-triclorofenol;
9. Investigar a ação nitrito-redutase da proteína *Hell's Gate I* por meio de sua ligação ao NO.

3. METODOLOGIA

Para o preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água ultrapurificada obtida por sistema de purificação MiliporeDirect Q® 3UV, resistividade > 18 MΩ.cm.

3.1. Genes

O plasmídeo da proteína *Hell's gate* utilizado neste trabalho trata-se do gene codificante da proteína completa HGbl de *Methyacidiphilum inferorum* (GenBank: ACD83150) clonado no vetor de expressão pET-3a, que possui gene que confere resistência a ampicilina. O gene foi desenhado para expressar a proteína com a região C-terminal fusionada a uma cauda de poli-histidina (*6xHis-tag*) para facilitar sua purificação.

3.2. Crescimento celular e expressão proteica

Todos os procedimentos que exigem esterilidade foram realizados próximos a uma chama de bico de Bunsen, utilizando vidrarias e soluções esterilizados mediante autoclavagem a 121 °C ou filtração com filtro estéril de poro de 0,22 µm.

O processo de transformação consiste na inserção de material genético estranho em uma célula bacteriana (SPIZIZEN, 1968). Para a transformação realizada nesse trabalho, 2 µL da solução contendo o plasmídeo clonado, na concentração de aproximadamente 1 µg/mL, foram misturados a 50 µL de solução contendo células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Os processos de transformação por eletroporação e plaqueamento foram realizados de acordo com metodologia descrita na literatura (ALAM, 2012; GALLUCCIO *et al.*, 2013; POTTER; HELLER, 2003).

No dia seguinte ao plaqueamento, foi selecionada uma colônia isolada de uma das placas e feito *restrick*, que consiste no espalhamento dessa colônia em uma nova placa com meio contendo antibiótico, de modo a proporcionar uma maior seletividade de células que realmente contenham o plasmídeo clonado. Após incubação (37 °C por 16 horas), foi retirada uma colônia e esta foi usada para inocular 5 mL de meio de cultura LB contendo ampicilina. Esse meio inoculado foi deixado a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após esse período, esse crescimento foi usado para inocular 3 L de meio de cultura (*Miller's LB Broth Base*) contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina,

sendo distribuídos em 4 *erlenmeyers* de 2 L de capacidade (750 mL de meio de cultura em cada). Em todos os crescimentos em meio de cultura líquido utilizou-se caldo LB previamente autoclavado na seguinte composição por litro: 10 g de Peptona, 5 g de Extrato de levedura e 10 g de NaCl. Este meio inoculado foi deixado a 37 °C e 180 rpm de agitação, até que atingida densidade ótica (OD_{600nm}) de aproximadamente 0,8. Nesse momento iniciou-se a fase de indução de expressão com a redução da temperatura para 30 °C e adição de 50 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de IPTG. Complementarmente, foram adicionados 100 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Após 14 horas de expressão, os crescimentos foram colocados em gelo por pelo menos 1 hora e centrifugados a 5.311 x *g* por 30 minutos a 4 °C, em centrífuga Allegra™ 25R BECKMAN COULTER™ (Alemanha). O *pellet* das células, cerca de 9 gramas, foi armazenado a -80 °C até ser iniciado procedimento de purificação, o que usualmente ocorreu em até um mês.

3.3. Purificação

Para a purificação da proteína foram usadas as seguintes soluções e reagentes:

- 2 mol L^{-1} NaCl (SIGMA®);
- 0,5 mol L^{-1} KCl (AMRESCO®);
- 1 mol L^{-1} Tris-HCl - Hidroclorato de Trisaminometano (SIGMA®) pH 8,0
- 0,175 mol L^{-1} EDTA - Etilenodiaminotetraacetato, sal dissódico, (REAGEN);
- 4 mol L^{-1} NH_4SO_4 (SERVA), 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA (REAGEN);
- 1 mol L^{-1} Imidazol (ACROS ORGANICS)
- 2-mercaptoetanol, min 98% (SIGMA®);
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (AMRESCO®);
- Lisozima de ovo branco de galinha (SIGMA®);
- Ni-NTA Agarose para purificação de proteínas *6xHis-tagged* (QUIAGEN)

3.3.1. Lise das células

Foi preparado tampão de lise com a seguinte composição: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0; 137 mmol L^{-1} NaCl; 5 mmol L^{-1} KCl; 5% glicerol; 1 mmol L^{-1} EDTA; 10 mmol L^{-1} 2-mercaptoetanol; 0,17 mg mL^{-1} PMSF; 0,1 mg mL^{-1} lisozima.

O *pellet* celular congelado foi ressuspensão em tampão de lise na proporção de 5 mL para cada 2 gramas de *pellet*, à temperatura ambiente. Após total ressuspensão, a mistura foi sonicada, sob agitação suave e em banho de gelo, com sonificador de sonda Vibracell™ SONICS (U.S.A.) durante 1 hora em 40% da amplitude máxima com ciclos alternados de 10 segundos de pulso e 60 segundos em repouso, sendo a temperatura checada periodicamente evitando que ultrapassasse 10 °C. O material sonicado foi centrifugado a 21.036 x g durante 40 minutos, a 4 °C, em centrífuga Allegra™ 25R BECKMAN COULTER™ (Alemanha). O sobrenadante de coloração vermelha foi reservado para a precipitação com sulfato de amônio e o *pellet* contendo os restos celulares foi descartado após tratamento com 5% de solução de hipoclorito de sódio.

3.3.2. Precipitação da fração proteica contendo HGbl

Após a centrifugação, foi adicionado lentamente ao sobrenadante, sob agitação, uma solução saturada de NH₄SO₄ (4 mol L⁻¹) até alcançar 55% da concentração de saturação, quando observou-se a formação de precipitado. Logo após essa precipitação, a mistura foi centrifugada a cerca de 21.036 x g durante 40 minutos, a 4 °C, sendo então descartado o sobrenadante (amarelo pálido), enquanto o precipitado (avermelhado) foi ressuspensão em aproximadamente 100 mL de tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0. A amostra ressuspensa foi deixada dialisando durante 14 horas em 3 L de tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0, em refrigerador a 4 °C.

3.3.3 Purificação em coluna Níquel-NTA Agarose

Todas as etapas da purificação subsequentes à precipitação com sulfato de amônio foram feitas a 4°C, em refrigerador panorâmico.

A amostra dialisada foi aplicada na coluna de níquel, com 6 mL de volume, previamente equilibrada com tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0. Nessa etapa de purificação foi feito acompanhamento por um cromatógrafo de baixa pressão FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) BIO-RAD (USA), com detector em 280 nm. Após a aplicação da amostra, foi feita lavagem da coluna com tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0, até que a absorbância observada no cromatograma fosse

praticamente zero. Foram feitas então sucessivas lavagens com tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0 com imidazol nas concentrações de 10, 30 e 50 mmol L⁻¹. Cada etapa de lavagem prosseguiu até que se observasse estabilização da absorbância, indicando ausência de contaminantes sendo eluídos. Em seguida, a proteína de interesse foi eluída com 75 mmol L⁻¹ imidazol em 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0.

Espectros eletrônicos na região do UV-Vis foram obtidos para as frações eluídas da coluna, sendo checado as razões de absorbância entre os máximos em 280 nm e 411 nm a fim de estimar a pureza de cada fração. As frações eluídas com menores R_z, entre 0,35 e 0,42, foram combinadas e essa fração global foi submetida a três diálises sucessivas contra tampão 10 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0; cada diálise foi feita usando 1 litro de tampão e com duração média de 1,5 hora. Adicionalmente, foi feita troca de tampão por meio de diluição em 50 mmol L⁻¹ Tris·HCl / 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 8,0, seguida de concentração em concentrador de proteína Millipore Amicon® 8050 sob pressão de argônio e agitação, utilizando uma membrana Amicon YM-10 (com massa molar limite de corte de 10 KDa).

Ao fim da purificação, à proteína concentrada foi adicionado 10% glicerol e foram feitas várias alíquotas, as quais foram congeladas com N₂ líquido e armazenadas a -80 °C.

Para confirmar a pureza das amostras e avaliar a eficiência do processo de purificação foi feito eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Foi utilizada acrilamida/bis-acrilamida, 37:1 (SIGMA®), na concentração de 12,5% no gel de separação. A tabela 1 descreve a formulação dos géis – gel de alinhamento e gel de separação.

O gel foi preparado utilizando suporte para montagem de gel de poliacrilamida BIO-RAD e placas com 1,0 mm de espaçamento. Às amostras foi adicionado tampão de amostra (2x) diluído apropriadamente, e em seguida estas foram aquecidas em banho-maria a 100°C durante 4 minutos. O tampão da amostra (2x) possui a seguinte composição: 0,125 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 4% Dodecil sulfato de sódio (SDS); 700 mmol L⁻¹ 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,2 mg mL⁻¹ azul de bromofenol (SIGMA®). Foi utilizado como marcador molecular *Protein Ladder* (New England BioLabs), um marcador com 12 proteínas com massa molecular entre 10 e 250 KDa.

Tabela 1 - Composição do gel usado na eletroforese SDS-PAGE.

Componente	Volume (μL):	
	gel de alinhamento (<i>stacking gel</i>)	gel de separação (<i>resolving gel</i>)
<i>Stacking gel buffer</i> (0,375 mol L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8)	450	---
<i>Resolution gel buffer</i> (0,125 mol L ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8)	---	750
Acrilamida/Bis-acrilamida, 30:1	300	2080
10% Dodecil sulfato de sódio (SDS)	18	50
H ₂ O	1020	2080
10% Persulfato de amônio	13,5	38
TEMED (tetrametiletilenodiamina)	2	2,5

Fonte: o autor.

Após a corrida o gel foi corado por 30 minutos sob agitação em contato com solução corante [5 g L⁻¹ azul de *Coomassie*, 7,5 % ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)], sendo em seguida descorado por 3 horas em solução descorante [7,5% ácido acético glacial (v/v) e 45% metanol (v/v)].

3.4. Ensaio Piridina-Hemocromogênio

Inicialmente, foram adicionados a 5 tubos eppendorf 400 μL de solução 4,2 mol L⁻¹ de piridina em 0,2 mol L⁻¹ NaOH. A cada um desses tubos foram adicionados 400 μL de solução da proteína analisada com concentrações estimadas em 10, 15, 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A concentração da solução estoque de proteína foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar da metmioglobina a 503 nm (9,8 mM⁻¹cm⁻¹). Após homogeneização, foram retirados 400 μL de cada um dos tubos e colocados em 5 tubos novos. Ao primeiro conjunto de alíquotas foi adicionado 25 mmol L⁻¹ de Na₂S₂O₄ e ao segundo conjunto foi adicionado 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de K₃[Fe(CN)₆]. Após adição dos agentes redutor e oxidante, as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 12000 rpm por 1 min. Foram

adquiridos os espectros de absorção eletrônica UV-Vis das amostras de 500 a 700 nm.

Paralelamente, os mesmos procedimentos foram realizados com amostras de hemina (10, 15, 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) substituindo as amostras de proteína. Para preparar a solução estoque de hemina foi solubilizado 3 mg do composto em 0,5 mL de solução 100 mmol L^{-1} NaOH, adicionado 4,5 mL de água e a solução foi filtrada (0,22 μm). Para determinar a concentração dessa solução foi feita uma diluição de 100 vezes em solução 2% borato de sódio pH 9,23, adquirido o espectro UV-Vis e utilizado o coeficiente de extinção a 390 nm ($50 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para determinar as concentrações das amostras, tanto de proteína quanto de hemina, foi feita uma subtração do valor da absorbância da amostra reduzida (com ditionito de sódio) a 556 nm menos o valor da absorbância da amostra oxidada (com ferricianeto de potássio) a 539 nm, e utilizado coeficiente de extinção molar como sendo $23,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (equação 1).

$$c = \frac{A_{red556} - A_{ox539}}{23,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}}$$

As concentrações das amostras de proteína foram multiplicadas por um fator de correção que consiste na razão entre a concentração real de hemina (determinada a partir da solução estoque) e a concentração determinada pelo método da piridina.

Foi construída uma curva onde no eixo x estão as concentrações de proteína e no eixo y estão as respectivas absorbâncias do máximo da banda Soret. Como as concentrações de proteína analisadas geram espectros de UV-Vis com absorbâncias superiores a 1, uma alíquota de cada solução foi diluída 10 vezes e seus espectros foram adquiridos. O coeficiente angular da reta que se ajusta aos dados experimentais corresponde ao coeficiente de extinção molar da proteína.

3.5. Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram adquiridos usando espectrofotômetro J-815 CD JASCO (Japão). Para medidas na região do ultravioleta distante (*far-UV*) foram adquiridos espectros na faixa de comprimento de onda de 190 a 270 nm, utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm e proteína na

concentração de aproximadamente $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,0 (PBS: *Phosphate Buffer Solution* / Solução de tampão fostato / $\text{Na}_2\text{HPO}_4:\text{NaH}_2\text{PO}_4$). Para medidas na região do ultravioleta próximo (*near-UV*) e do visível foram adquiridos espectros nas faixas de 255 a 320 nm e de 300 a 500 nm, respectivamente; utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ da proteína HGBI em tampão 50 mmol L^{-1} PBS/ 100 mmol L^{-1} NaCl pH 7,0. As medidas foram obtidas nas seguintes condições experimentais otimizadas *data pitch* de 0,5 nm; *D.I.T.* de 1 segundo; *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 100 nm min^{-1} ; 5 acumulações. Todas as medidas foram feitas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, exceto em casos particulares indicados no texto.

3.5.1. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da HGBI foi medida utilizando dicroísmo circular. Foi acompanhada a variação na elipticidade a 222 nm, na faixa de temperatura de 5 a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, com um intervalo de $2 \text{ }^\circ\text{C}$ entre cada medida. As aquisições foram feitas 1 minuto após a temperatura ter estabilizado no valor desejado. A temperatura foi controlada por meio de aparelho acessório *peltier*. A proteína foi diluída para $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução 10 mmol L^{-1} fosfato de sódio, pH 5,5 e 7,0. Embora a solução de fosfato de sódio não funcione como tampão em pH 5,5, espera-se que o pH seja mantido já que o volume de proteína adicionado é insignificante em comparação com o volume total de solução.

3.5.2. Predição da estrutura secundária

Os espectros de dicroísmo circular da HGBI foram submetidos a análise pelos programas Selcon3, K2d, Contin-LL (disponibilizados pela plataforma digital DichroWeb – <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk> (Instituto de Biologia Molecular e Estrutural, Universidade de Londres) e BestSel – <https://bestsel.elte.hu> (Instituto de Biologia, Universidade Eötvös Loránd, Budapeste). A princípio a faixa de comprimento de onda analisada foi de 185 a 255 nm, podendo ser um pouco menor dependendo do tipo de programa utilizado.

3.6. Fluorescência Intrínseca

Espectros de emissão foram adquiridos usando Espectrofotômetro Shimadzu RF-6000 (Japão). Foram feitas medidas de fluorescência intrínseca com excitação em dois comprimentos de onda e faixas de emissão distintas: excitação a 280nm e emissão de 290 a 420 nm; e excitação a 295 nm e emissão de 305 a 420 nm. A velocidade de varredura foi de 600 nm min⁻¹ e *bandwidths* (excitação e emissão) de 20 nm. A concentração de HGbI foi 3 μmol L⁻¹ em tampão 50 mmol L⁻¹ PBS/100 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,0. Após a coleta, foi feita a subtração do espectro do tampão a fim de excluir a interferência do espalhamento Raman.

3.7. Espectrometria de Massas

A determinação da massa molecular média da proteína foi realizada por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.) de Ionização por *electrospray* (ESI-MS). Para isso, a proteína foi solubilizada a uma concentração de 10 pmol μL⁻¹ em uma solução aquosa de acetonitrila 50% (ACN) contendo 0,2% de ácido fórmico (AF) e foi infundida no sistema. Alternativamente a proteína foi solubilizada apenas em água e submetida a ionização. A calibração do equipamento foi realizada com íons derivados do ácido fosfórico e os espectros de massa foram obtidos com m/z variando de 100 a 1500 m/z, operado em modo positivo, usando uma fonte de temperatura de 363 K e tensão capilar em 3,2 kV. Para a coleta e o processamento de dados foi utilizado o software Mass Lynx 4.1 (Waters).

3.8. Avaliação da Estabilidade da HGbI em diferentes valores de pH

A fim de monitorar possíveis mudanças na estrutura da HGbI em decorrência do pH do meio, foram feitas medidas de espectroscopia de absorção eletrônica, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência em diferentes tampões, numa faixa de pH de 1,5 a 13. A tabela 2 indica quais tampões foram usados e seus respectivos valores de pH. O ajuste dos valores de pH foi feito usando HCl e NaOH. Em todos os tampões foi adicionado 150 mmol L⁻¹ NaCl para ajustar a força iônica.

Tabela 2 - Tampões utilizados e seus respectivos pHs.

pH	Tampão	pH	Tampão	pH	Tampão
1,5	PBS	5,0	Citrato	8,5	Tris – H ₃ BO ₃
2,0	PBS	5,5	Citrato	9,0	BTP – Tris – H ₃ BO ₃
2,5	PBS	6,0	Citrato	10,0	BTP
3,0	PBS – Citrato	6,5	PBS – Citrato	11,5	PBS
3,5	Citrato	7,0	PBS – BTP	12,0	PBS
4,0	Citrato	7,5	PBS	12,5	PBS
4,5	Citrato	8,0	PBS – BTP – Tris	13,0	PBS

Fonte: o autor.

* PBS (tampão fosfato): NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄. Tampão citrato: C₃OH(COOH)₃ / NaOCC₃OH(COOH)₂. BTP (Bis-Tris-Propano): C₁₁H₂₆N₂O₆. Tris: C₄H₁₁NO₃.

As concentrações de Hgbl utilizadas foram de 2 µmol L⁻¹ para medidas de espectroscopia de absorção eletrônica; 20 µmol L⁻¹ para as medidas de CD e 3 µmol L⁻¹ para as medidas de fluorescência.

Alternativamente, foi realizada titulometria volumétrica acompanhando a variação do pH por pHmetro de bancada Metrohm. A proteína foi diluída para concentração de 5 µmol L⁻¹ em solução 100 mmol L⁻¹ NaCl, em seguida o meio foi basificado por adição de NaOH até pH 12. Foram feitas adições sucessivas de HCl para acidificação do meio. Após cada etapa de acidificação, foram adquiridos os espectros de absorção eletrônica UV-Vis.

3.9. Remoção do Grupo Heme

Com intuito de se obter a proteína Hgbl em sua forma *apo*, isto é, sem o grupo prostético, realizou-se o ensaio de remoção do heme com detergente Tween20™ (SCHMIDT *et al.*, 2003). A proteína, na concentração de 4 µmol L⁻¹, foi incubada em tampão I (50 µmol L⁻¹ EDTA; 1,5 mmol L⁻¹ MgCl₂; 50 mmol L⁻¹ Tris·HCl pH 8,0)

contendo 10% Tween20™. A incubação ocorreu 50 rpm em agitador orbital durante 6 horas a 37 °C, sendo previamente feita otimização do tempo.

As demais etapas foram realizadas a 4 °C, em refrigerador vertical. Após a incubação para remoção do grupo heme, a solução contendo a proteína foi diluída 4 vezes com tampão I gelado (~4 °C) e aplicada numa coluna de troca aniônica Q-Sepharose de 6 mL de volume, previamente equilibrada com tampão I. A coluna contendo a amostra foi lavada com 100 mL de tampão I, e então foi feita eluição da proteína com tampão II (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EDTA; 1,5 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 300 mmol L^{-1} NaCl; 50 mmol L^{-1} Tris·HCl pH 7,3). A amostra eluída foi submetida a 3 diálises consecutivas em tampão 10 mmol L^{-1} Tris·HCl pH 8,0, durante 2 horas cada diálise, com o objetivo de remover detergente residual. O volume de amostra foi 50 mL e o volume de tampão em cada diálise de 1 L. Após as diálises, a amostra foi concentrada em Centricon (massa molar de corte 10 KDa). Foram realizadas medidas espectroscópicas de absorção eletrônica, dicroísmo circular e fluorescência.

3.10. Ensaios de Atividade Peroxidase

A atividade peroxidase da HGbI foi investigada através de ensaios com o-fenilenodiamina (OPD) (FORNERA; WALDE, 2010b), guaiacol (HAYASHI *et al.*, 1999), (TANAKA *et al.*, 1997) e 2,4,6-triclorofenol (TCP) (YIN *et al.*, 2018a) como substratos. Os reagentes utilizados foram de grau analítico (Sigma). Em paralelo a esses ensaios foram realizadas medidas com a mioglobina (mioglobina de coração de equino, SIGMA). Ambas as proteínas foram usadas em sua forma *met* (Fe^{3+}). A mioglobina liofilizada foi ressuspensa em tampão 10 mmol L^{-1} fosfato e sua concentração foi calculada usando coeficiente de extinção molar para forma oxidada ($\lambda_{\text{máx}} = 503 \text{ nm}$, $9.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As reações foram realizadas em cubeta de quartzo e acompanhadas através das mudanças nos espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e do visível, utilizando Espectrofotômetro Cary 5000 (USA). O volume reacional foi de 2 mL. As reações foram iniciadas pela adição de peróxido de hidrogênio.

3.10.1. Atividade peroxidase empregando o-fenilenodiamina (OPD)

As concentrações empregadas foram de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína (HGbI ou Mb); 3,5 mmol L^{-1} de OPD e 3,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 . Os ensaios foram realizados a

25°C e 50°C, com temperatura controlada mediante banho termostático. A reação foi promovida em tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,2, tendo início pela adição de H₂O₂.

3.10.2. Atividade peroxidase empregando Guaiacol

As concentrações empregadas foram de 1 µmol L⁻¹ de proteína (HGbl ou Mb) e 2 mmol L⁻¹ de Guaiacol diluídos em tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,0; e a reação teve início pela adição de 2 mmol L⁻¹ H₂O₂. Os ensaios foram realizados a 25°C.

3.10.3. Desaloperoxidase do 2,4,6-triclorofenol (TCP)

A reação foi promovida em tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,0 utilizando 2 µmol L⁻¹ de proteína; 0,1 mmol L⁻¹ de substrato (TCP) e 0,5 mmol L⁻¹ de H₂O₂.

3.11. Atividade Nitrito-Redutase

Para esse ensaio, em câmara anaeróbica, a proteína foi diluída na cubeta para concentração de 5 µmol L⁻¹ em tampão 10 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,2 e em seguida foi adicionado 2,5 mmol L⁻¹ Na₂S₂O₄. Após 20 minutos foi verificada a redução da proteína (forma deoxi, Fe²⁺), confirmado pelo típico espectro de absorção no UV-vis. À proteína reduzida foi adicionado 1 mmol L⁻¹ de NaNO₂ e novamente adquirido o espectro eletrônico no UV-vis após 20 minutos.

Complementarmente, a proteína reduzida foi incubada com a molécula doadora de óxido nítrico, dietilamina nonoato (DEANONOate). Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 5 mmol L⁻¹ de dietilamina nonoato de sódio hidratada em 50 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 150 mmol L⁻¹ NaCl pH > 9,0. A proteína concentrada foi colocada em câmara anaeróbica e incubada com 2 mmol L⁻¹ Na₂S₂O₄ por 30 min. Em seguida, foi aplicada em uma coluna Sephadex G-25 e eluída com tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl pH 7,0 para remoção do redutor. A amostra coletada foi diluída para aproximadamente 3 µmol L⁻¹, adicionando 50 µmol L⁻¹ de DEANONOate, deixado em incubação por 15 min e adquirido o espectro de UV-Vis.

3.12. Cromatografia de Filtração em Gel

Foi realizado o estudo de filtração em gel para averiguar alterações conformacionais na proteína decorrentes de mudanças no estado de oxidação do heme e do pH do meio. Utilizou-se cromatógrafo UFLC Shimadzu LC-20AT/ CBM-20A / SPD-M20A (Japão) com coluna QC-PAK GFC 300 (diâmetro interno 7,8mm x 15 cm. A amostra foi aplicada na coluna com concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, o fluxo mantido em 1 mL min^{-1} e a pressão se manteve em 37 kgf. Foram utilizados tampões 50 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl com pH entre 5 e 7,5.

3.13. Reações de *cross-linking*

Foram investigadas as reações da HgbI com três reagentes de *cross-linking* diferentes: hexafluorofosfato de tris(2,2'-bipiridina) de rutênio (II) ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$), suberato de dissuccinimidil (DSS) e *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC). Esses reagentes foram individualmente misturados com $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína em tampão 100 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl pH 7,4. O complexo de rutênio usado funciona como um agente de *cross-link* fotoativado, sendo adicionado à proteína $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ do complexo de rutênio juntamente com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de persulfato de amônio e em seguida a amostra foi irradiada com LED azul por 1 h. O mesmo procedimento foi realizado sem submeter a amostra a irradiação. Os outros reagentes, DSS e SMCC, foram utilizados nas concentrações de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, e deixados em incubação por 2 h. Após o tempo de incubação as amostras foram diluídas até $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína e foram submetidas a filtração em gel (tampão 100 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl pH 7,4 e fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$).

3.14. Ligação do cianeto a HgbI

Foi feito o acompanhamento da ligação de CN^- a HgbI utilizando espectroscopia eletrônica na região do UV-vis, especificamente a mudança observada na banda Soret quando a proteína passa da forma met (Fe^{3+}) para cianomet (CN-Fe^{3+}). Esse ensaio foi realizado em duplicata em quatro diferentes pHs (5,5; 7,4, 8,5 e 9,5) a 25°C , sendo que no caso do menor pH foi feita uma investigação em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C). Para manter a temperatura fixa utilizou-se banho

termostatizado TE-2005 Tecnal (Brasil), sendo a temperatura do banho monitorada com termômetro externo. A amostra foi diluída em cubeta de quartzo para concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 50 mmol L^{-1} fosfato, 100 mmol L^{-1} NaCl. Em seguida, foi adicionada solução de KCN para concentração desejada e iniciada imediatamente a aquisição de espectros de UV-Vis até que não houvesse mais variação nas bandas.

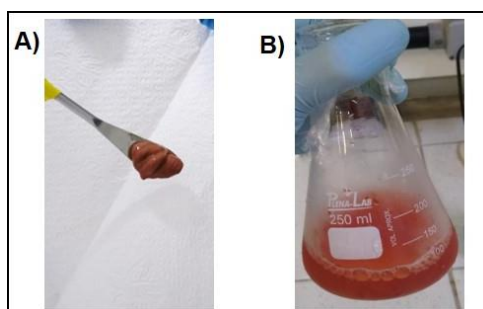
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação da Proteína HGbl Recombinate (*Hell's Gate globin I*)

Apesar do procedimento de produção da proteína HGbl contendo *his-tag* já ter sido descrito na literatura (TEH *et al.*, 2011), foram realizadas algumas alterações procedimentais na sua produção e isolamento. Além disso, é importante validar que a produção da proteína ocorreu de maneira correta obtendo-se uma proteína de qualidade, como atestado posteriormente.

Dessa forma, ao final dos processos de crescimento bacteriano e expressão de proteína, descritos na parte experimental, foi obtido um *pellet* celular com coloração vermelha intensa, o qual, após lise celular, resultou numa fração aquosa avermelhada (Figura 4). O fato do *pellet* e da fração solúvel se apresentarem avermelhados é, geralmente, indício de uma intensa produção de proteína hémica em sua forma solúvel.

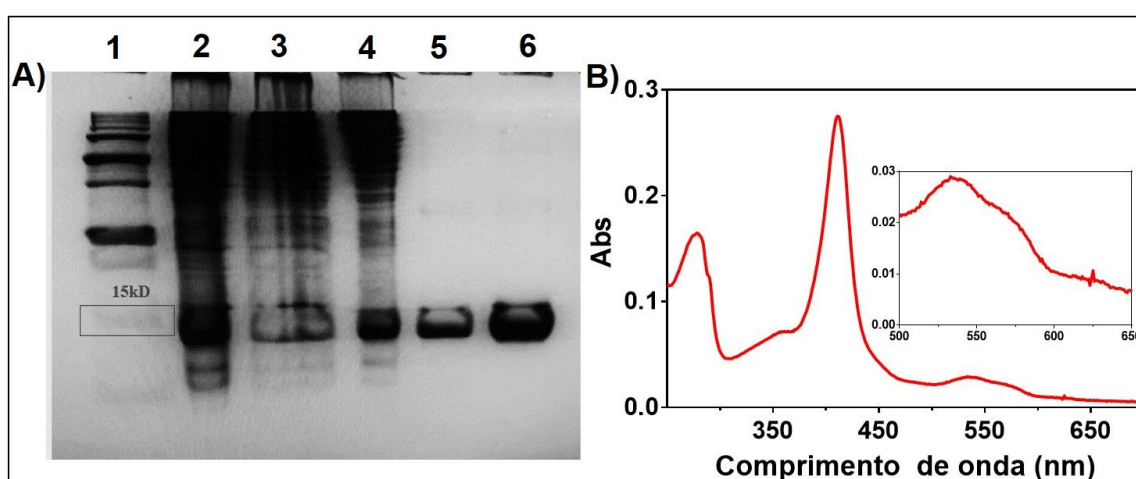
Figura 4 - Produção da proteína HGbl. A) Pellet celular obtido após centrifugar cultura celular ao fim do processo de expressão. B) Fração solúvel obtida após a lise das células e centrifugação.



Fonte: o autor.

A Figura 5-A apresenta o gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS) obtido com amostras coletadas durante o processo de purificação da proteína. Adicionalmente, apresenta-se o espectro de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível para a proteína obtida ao final da purificação (5-B).

Figura 5 - Análise da purificação da HGbI 6xHis-tag. A) imagem do gel desnaturante de poli(acrilamida) (PAGE-SDS, 12,5% poli(acrilamida)). Às amostras foi adicionado tampão contendo o redutor 2-mercaptoetanol. Poços: 1- marcador molecular de proteína (BioRad); 2- Fração solúvel (citossólica) após lise celular; 3- Precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ressuspensão em tampão; 4- Precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ressuspensão e após diálise; 5- Amostra eluída da coluna Ni-NTA; 6- Amostra final após diálise para remoção do imidazol e posterior concentração. B) Espectro de absorção eletrônica da HGbI 6xHis-tag ao fim da purificação, em tampão 50 mmol L^{-1} PBS / 100 mmol L^{-1} NaCl pH 7,0.



Fonte: o autor.

A proteína foi obtida com alto grau de pureza, de acordo com a eletroforese em gel, sendo observado uma única banda no poço referente a amostra final (Figura 5-A). A banda observada no gel próxima ao marcador molecular de 15 KDa corresponde satisfatoriamente a massa da proteína de 15,9 KDa. Em relação ao espectro eletrônico na região do UV-Vis, a banda Soret juntamente com o perfil das bandas Q são bastante úteis para a caracterização desta proteína, sendo observado a banda Soret em 412 nm, enquanto as bandas Q foram observadas em 535 nm e 575 nm. Este espectro é típico da proteína HGbI majoritariamente na sua forma *met* (Fe^{3+}) (TEH *et al.*, 2011), indicando que fora isolada na sua forma oxidada. Adicionalmente, a razão entre a banda em 280 nm, típica para proteínas em geral, e a banda Soret, serve também como indício do grau de pureza de hemoproteínas (Rz). Nessa purificação o Rz foi de 0,57. A massa estimada de proteína obtida foi de 9,7 mg. Considerando que o volume de meio de cultura utilizado no crescimento celular

foi de 3 litros, o rendimento de proteína purificada foi de aproximadamente 3,2 mg por litro.

4.2. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar (ϵ)

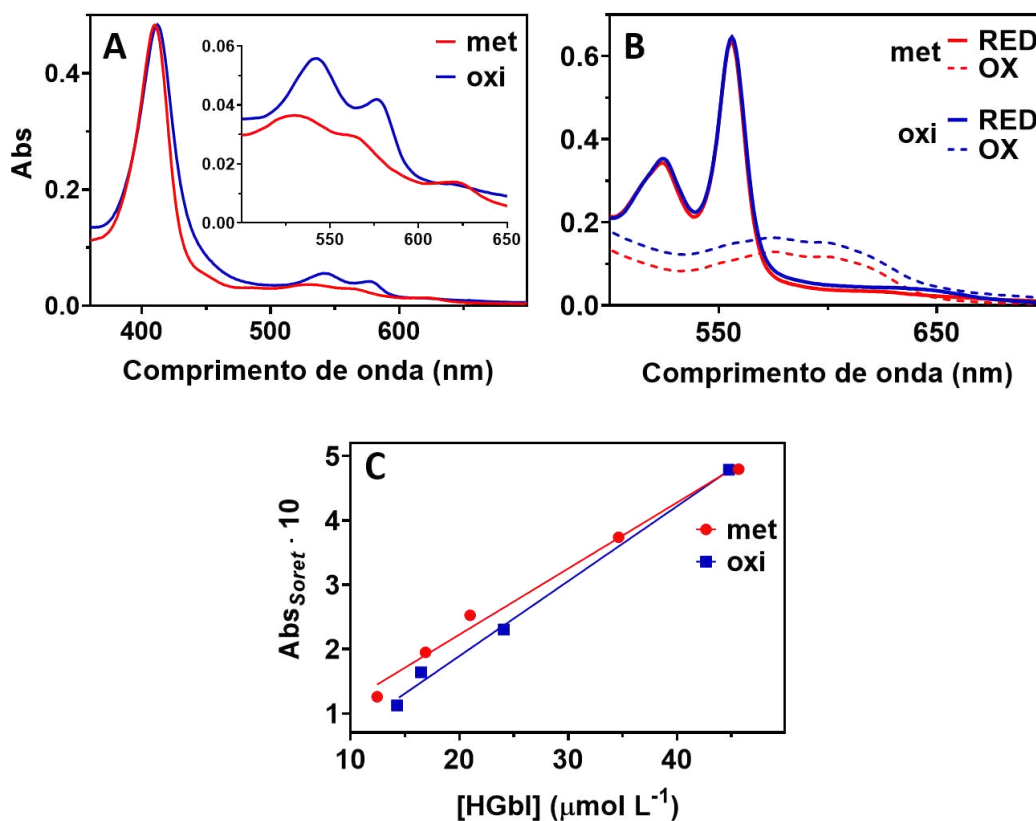
A determinação da concentração de uma proteína em solução (ou qualquer outra molécula) tem importância crucial, considerando que muitas medições e processos são dependentes da quantificação das espécies em solução. Comumente, a determinação da concentração de uma proteína em solução é feita através do seu espectro de absorção eletrônica quando o coeficiente de extinção molar (ϵ) em um dado comprimento de onda é conhecido. No caso de proteínas contendo o grupo heme é comum que seja determinado o valor do ϵ no comprimento de onda máximo da banda Soret. Muitas vezes a determinação do ϵ é feita de maneira indireta, determinando a concentração da espécie em solução através de métodos cromogênicos que envolvem a adição de reagentes específicos.

Com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar da HgbI referente à banda Soret, foi feita a quantificação de grupo heme por meio do ensaio piridina-hemocromogêneo. Dadas as condições desnaturantes utilizadas no ensaio (pH ~ 1), o grupo heme apresenta-se livre. A piridina liga-se, através de seu átomo de nitrogênio, às posições axiais do ferro do grupo heme exclusivamente na forma Fe^{2+} , gerando um complexo hexacoordenado estável e com bandas de absorção eletrônica características na região do visível (bandas β e α).

Na Figura 6-A são apresentados os espectros eletrônicos na região do UV-Vis de amostras de HgbI nas formas met (Fe^{3+}) e oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) que foram utilizadas no ensaio com piridina. É importante salientar que para obtenção desses espectros as amostras originais foram diluídas 10 vezes. O máximo da banda Soret apresentou-se em 410 nm para a forma met e 412 nm para a amostra oxi. Na região do visível, as diferenças espectrais entre essas duas formas são mais acentuadas. Quando a proteína se encontra na forma reduzida ligada ao O_2 , as bandas β e α aparecem bem definidas em 542 e 577 nm, respectivamente. Enquanto que na forma met observa-se uma banda em 532 nm com um ombro centrado em aproximadamente 565 nm, além de uma banda de menor intensidade em 621 nm. Em hemeproteínas, as bandas de transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel tetrapirrólico, sobretudo as bandas Q (entre 500 e 600 nm), são indicativas do estado de oxidação do ferro e também de sua

coordenação(ADAR, 1978). O espectro eletrônico no UV-Vis da HGbI em sua forma Fe^{3+} sugere hexacoordenação com um ligante endógeno, assim como ocorre na neuroglobina e em outras proteínas (Tabela 3). Através de dados cristalográficos, sabe-se que um resíduo de histidina da proteína (His82) se coordena ao ferro do heme na posição proximal (TEH *et al.*, 2011), entretanto a natureza do sexto ligante permanece desconhecida.

Figura 6 - Ensaio Piridina-Hemocromogêneo. A) Espectros eletrônicos no UV-Vis da HGbI nas formas met e oxi após diluição de 10 vezes. B) Espectros eletrônicos no UV-Vis da HGbI nas formas met e oxi após adição do reagente piridina na presença de agente redutor (ditionito de sódio) e agente oxidante (ferricianeto de potássio). C) Relação entre a concentração de proteína e a absorção máxima da banda Soret.



Fonte: o autor.

Tabela 3 - Comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) relativos às bandas Soret e Q de hemoproteínas no estado oxidado Fe^{3+} .

Ligante distal	Proteína	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (ϵ (L mmol ⁻¹ cm ⁻¹))		
H ₂ O	Mioglobina (WOOD, 1984)	408 (188)	502 (10,2)	540
	Hemoglobina (<i>H. sapiens</i>)	406 (162)	500 (9,0)	-
	DevS (<i>Mtb</i>) (IOANOVICHI <i>et al.</i> ,	406	500	-
	Leghemoglobina a (soja)	403 (157)	495 (10,7)	530 (9,9)
	Leghemoglobina I	405	503	-
Resíduo interno	Neuroglobina (ASCENZI <i>et al.</i> ,	414 (129)	532 (10,7)	~560
	CooA (<i>C. hydrog.</i>) (INAGAKI <i>et</i>	415 (121)	529	559
	Citocromo c (WOOD, 1984)	410 (106)	528 (11,0)	560
	Hemoglobina (<i>Hordeum sp.</i>)	411 (141)	534 (22,0)	565
	AfGcHK (KITANISHI <i>et al.</i> , 2011)	411	538	-
	HGbl	410 (103)	532	565

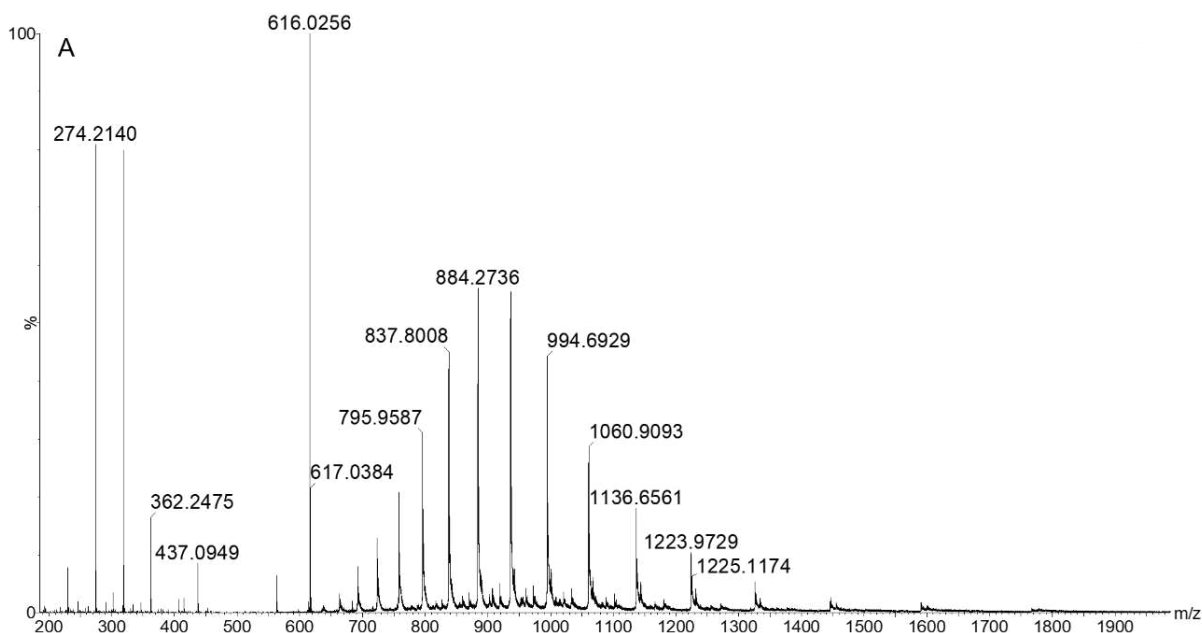
Fonte: elaborada pelo autor.

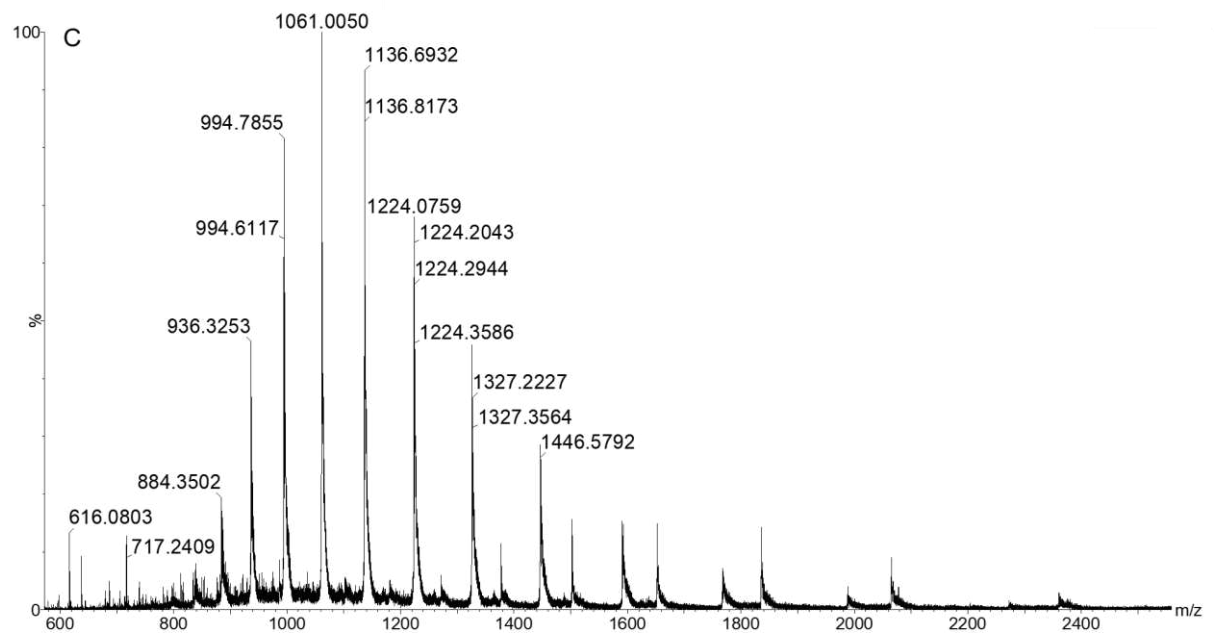
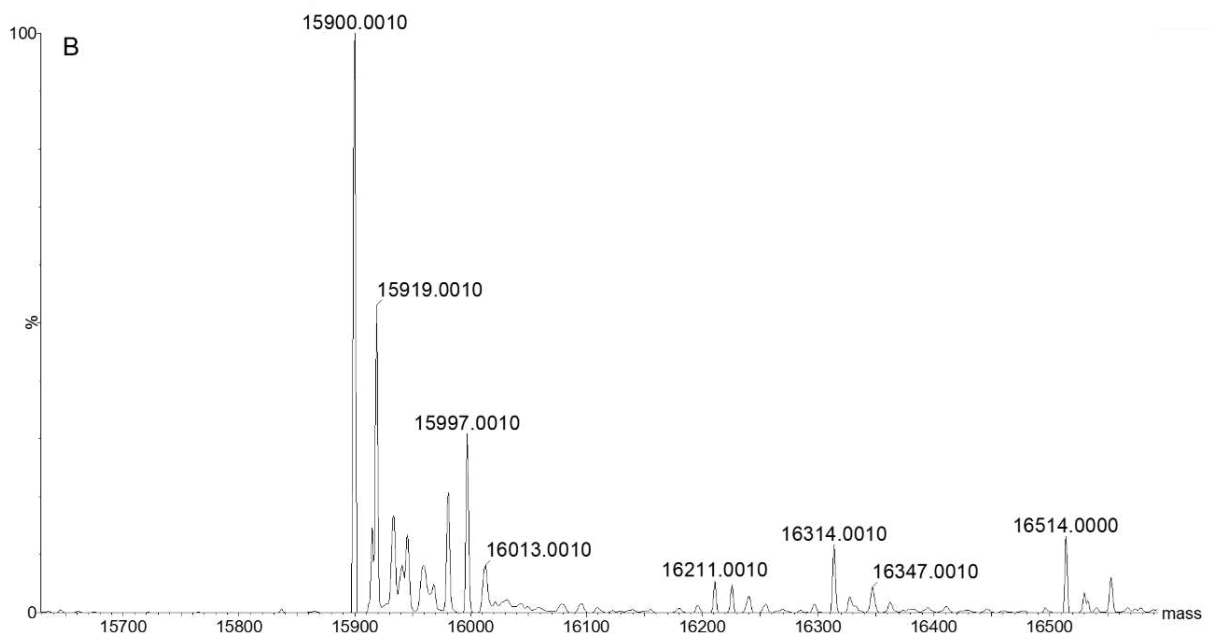
Após incubação com piridina, a HGbl reduzida com ditionito de sódio apresenta espectro eletrônico no UV-Vis com uma banda α com máximo em 556 nm (Figura 6-B), indicando a formação do complexo pyr₂-heme *b*. Como a proteína possui um grupo prostético por cadeia polipeptídica, é possível inferir que a concentração molar de proteína em uma dada amostra é igual a concentração molar de heme determinada pela ligação com piridina. Na Figura 6-C é possível observar a relação de linearidade entre as concentrações de HGbl e os valores de absorvância da banda Soret. Por meio do coeficiente angular da reta que se ajusta aos valores do gráfico foram determinados os coeficientes de extinção molar da HGbl nas formas met e oxi; os quais foram 102,7 ($\pm 6,0$) e 116,5 ($\pm 5,8$) L mmol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente. Os valores encontrados são da mesma ordem de grandeza daqueles verificados para outras hemoproteínas, 10⁵ L mol⁻¹ cm⁻¹, valores típicos de transições eletrônicas permitidas, do estado fundamental (S₀) para o estado excitado de maior energia, S₂.

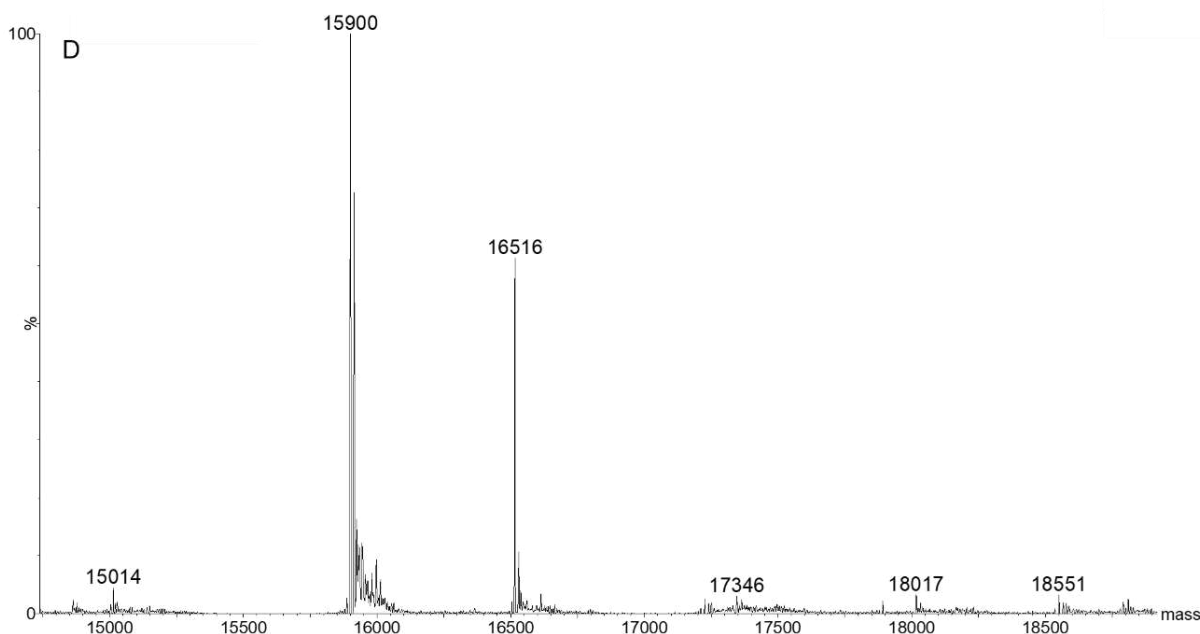
4.3. Massa intacta da HGbl

Com objetivo de determinar a identidade e integridade da proteína obtida ao final da purificação foi realizada a espectrometria de massas com HGbl em sua forma oxidada (Fe^{3+}). Foram feitas ionizações com a amostra diluída em solução 50/50 acetonitrila/água (0,2% ácido fórmico) e diluída apenas em água. Nas duas condições a ionização ocorreu de maneira satisfatória. Na Figura 7 estão apresentados os espectros de massas da proteína. Na Figura 7-A observa-se o pico do íon molecular com massa de 616,02 Da, o qual pode ser atribuído ao grupo heme (616,15 Da) que deve ter se dissociado da cadeia proteica durante a ionização. O pico do íon molecular que aparece em 7-B é referente a massa de 15.900 Da, um valor quase idêntico à massa calculada a partir da sequência de aminoácidos da HGbl (0,06% erro). Na amostra diluída em água mesmo após a ionização uma parte considerável de moléculas de proteína manteve com seu grupo prostético preservado, tendo em vista que um pico com massa 16.516 Da pode ser observado (Figura 7-D).

Figura 7 - Espectros de massa da HGbl- Fe^{3+} (met). A) e B) Espectro massa-carga (m/z) e espectro de massas em solução 50/50 acetonitrila/água (0,2% ácido fórmico). C) e D) Espectro massa-carga (m/z) e espectro de massas em água.







Fonte: o autor.

4.4. Estrutura secundária da proteína HGbI

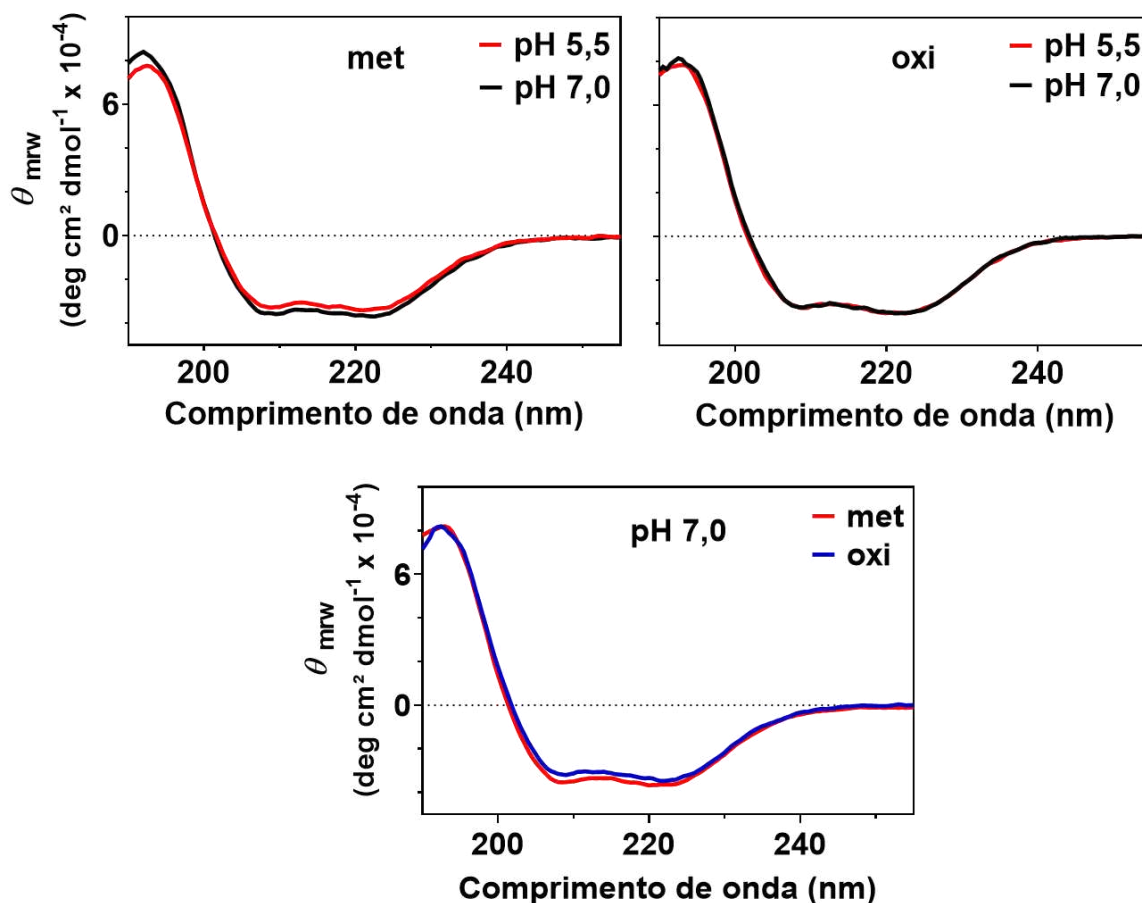
De acordo com as estruturas cristalográficas da HGbI em suas formas oxi e met ligada ao acetato, publicadas em 2011 (PDB:3S1I e PDB: 3S1J), a proteína é formada por sete α -hélices (TEH *et al.*, 2011), tendo mais de 85% de seus aminoácidos organizados nesse tipo de estrutura. Sabe-se que, apesar das estruturas determinadas por raios-X serem muito elucidativas, informações estruturais de proteínas em solução trazem um esclarecimento especial; tendo em vista que quase sempre seu ambiente natural é em solução. Aliado a isso, a dificuldade de se obter cristais de proteínas nativas e inteiras torna a cristalografia uma técnica laboriosa e muitas vezes impossibilitada, inclusive podendo usar condições para cristalização, como pH, bastante distintas da condição fisiológica.

A espectroscopia de dicroísmo circular vem sendo usada para estimar o tipo de estrutura secundária no qual uma proteína se organiza em solução. Por exemplo, proteínas formadas majoritariamente por α -hélices apresentam bandas de elipticidade negativa em 222 e 208 nm, além de uma banda positiva em 193 nm. Estruturas de β -folhas antiparalelas geram uma banda negativa em 218 nm e uma positiva em 195 nm. Enquanto proteínas com estrutura desordenada possuem baixa elipticidade

positiva acima de 210 nm e uma banda negativa próxima de 195 nm (GREENFIELD, 2006).

O espectro de dicroísmo circular da HgbI na forma *met* cobrindo a região do ultravioleta distante (*far-UV*) foi adquirido com a proteína diluída em solução 10 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 5,5 e 7,0 (Figura 8). A concentração empregada de proteína foi 2 μmol L⁻¹.

Figura 8 - Espectros de dicroísmo circular da HgbI nas formas Fe³⁺ (*met*) e Fe²⁺-O₂ (*oxi*) na região do ultravioleta distante, proteína na concentração de 2 μmol L⁻¹ em solução 10 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 5,5 e 7,0 a 25 °C.



Fonte: o autor.

A forma global dos espectros e, especificamente, a presença das bandas com sinais negativo em 208 e 222 nm e da banda com sinal positivo em 192 nm indicam que a proteína em solução se apresenta organizada majoritariamente em α -hélices,

assim como demonstrado por cristalografia de raios-X (PECHKOVA *et al.*, 2012; TEH *et al.*, 2011). Em relação a mudança no pH de 5,5 para 7,0, aparentemente não existem diferenças relevantes nesse nível estrutural da proteína. O mesmo pode ser dito quando comparamos a forma met à forma oxi, dado o grau de similaridade entre os espectros.

Após submeter os espectros de CD da HGbl aos programas K2d, Contin-LL e BestSel foram encontrados os valores estimados para os principais tipos de estrutura secundária da proteína, os quais são apresentados na tabela 4. A análise usando Selcon3 não se ajustou bem aos dados (NRMSD > 0,25). Observou-se que as estruturas em α -hélices compõem mais de 80% da cadeia polipeptídica da HGbl. Além disso, estruturas β -folhas não se apresentam significativamente na proteína; de modo que as estruturas remanescentes devem ser “voltas” ou estruturas desordenadas conectando as hélices.

Comparativamente às outras proteínas globinas, os valores encontrados são bastante semelhantes. A mioglobina, por exemplo, teve sua estrutura secundária estimada a partir do espectro de CD e foram encontrados valores de 84,5% para α -hélices, 2% para β -folhas e 16,1% para “voltas” e estruturas desordenadas (ESLAMI-FARSANI *et al.*, 2022). Perfis estruturais similares foram encontrados para hemoglobina, a qual apresentou 78,6% de α -hélices e menos de 2% de β -folhas (DING *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Estruturas secundárias presentes na HGbl determinadas utilizando os softwares Contin-LL e BestSel a partir da análise do espectro de dicroísmo circular.

Software	Estrutura (%)	pH	
		5,5	7,0
Contin-LL	Hélices	83,4	83,9
	Folhas	3,0	3,1
	Voltas	1,0	1,3
	Desordenada	12,5	11,6
BestSel	Hélices	87,7	93,5
	Voltas	6,4	6,5
	Outras	5,9	0

Fonte: o autor.

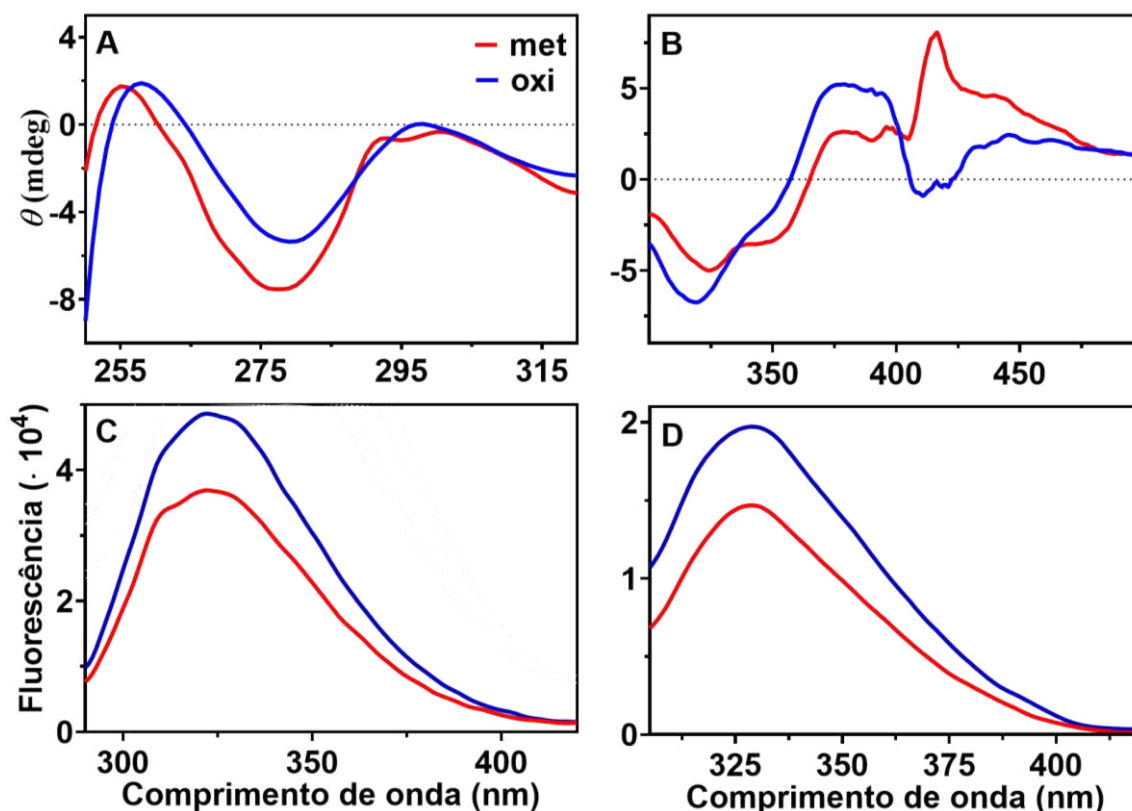
4.5. Diferenças Espectroscópicas entre as Formas Met e Oxi da HGbI

Recombinante

As técnicas de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular são bastante úteis na investigação estrutural de proteínas. Embora não seja possível obter informações sobre a conformação absoluta das macromoléculas, é possível acompanhar mudanças em sua estrutura tridimensional. Os resíduos de aminoácidos aromáticos, sobretudo triptofano e tirosina, são os principais grupos cromóforos em proteínas que absorvem radiação na região do ultravioleta próximo. Diferenças nas bandas dos espectros de dicroísmo e fluorescência indicam mudanças no ambiente desses aminoácidos ocasionadas por alterações nas estruturas terciária e/ou quaternária da proteína.

Na figura 9-A são apresentados os espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo para a HGbI Fe^{3+} (met) e $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi). É possível inferir que a proteína assume conformações diferentes a depender de seu estado de oxidação e/ou natureza do ligante distal. Pela técnica de fluorescência (Figuras 9-C e 9-D) também é possível dizer que há mudanças na estrutura terciária da proteína. Ao excitar em 295 nm, garante-se que somente os triptofanos absorvem e emitem fluorescência. Dessa forma, os aminoácidos W14 e W1119 da HGbI sofrem mudanças em seu ambiente quando a proteína passa da forma oxi para a forma met. Especificamente, a forma oxi apresenta sinais de fluorescência mais intensos o que pode ser em decorrência de dois fatores: nesta forma o grupo heme, que é um agente supressor de fluorescência, encontra-se mais distante dos aminoácidos aromáticos ou a proteína adquire uma conformação em que estes aminoácidos estão mais protegidos no interior da estrutura e menos expostos ao solvente (solução aquosa). O sinal menos intenso de fluorescência pode indicar que a proteína esteja numa forma não oligomerizada, analogamente ao que já foi reportado para hemoglobina. Em um estudo envolvendo uma Hb mutante capaz de formar dímeros ao invés de tetrâmeros observou-se uma diminuição na fluorescência em relação a proteína nativa (HIRSCH, 2002).

Figura 9 - Diferenças espectroscópicas entre a HGbl nas formas Fe^{3+} (met) e $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi). A) Espectros de dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo. B) Espectros de dicroísmo circular na região da banda Soret. C) Espectros de emissão de fluorescência com excitação em 280 nm. D) Espectros de emissão de fluorescência com excitação em 295 nm.



Fonte: o autor.

4.6. Estabilidade da HGbl

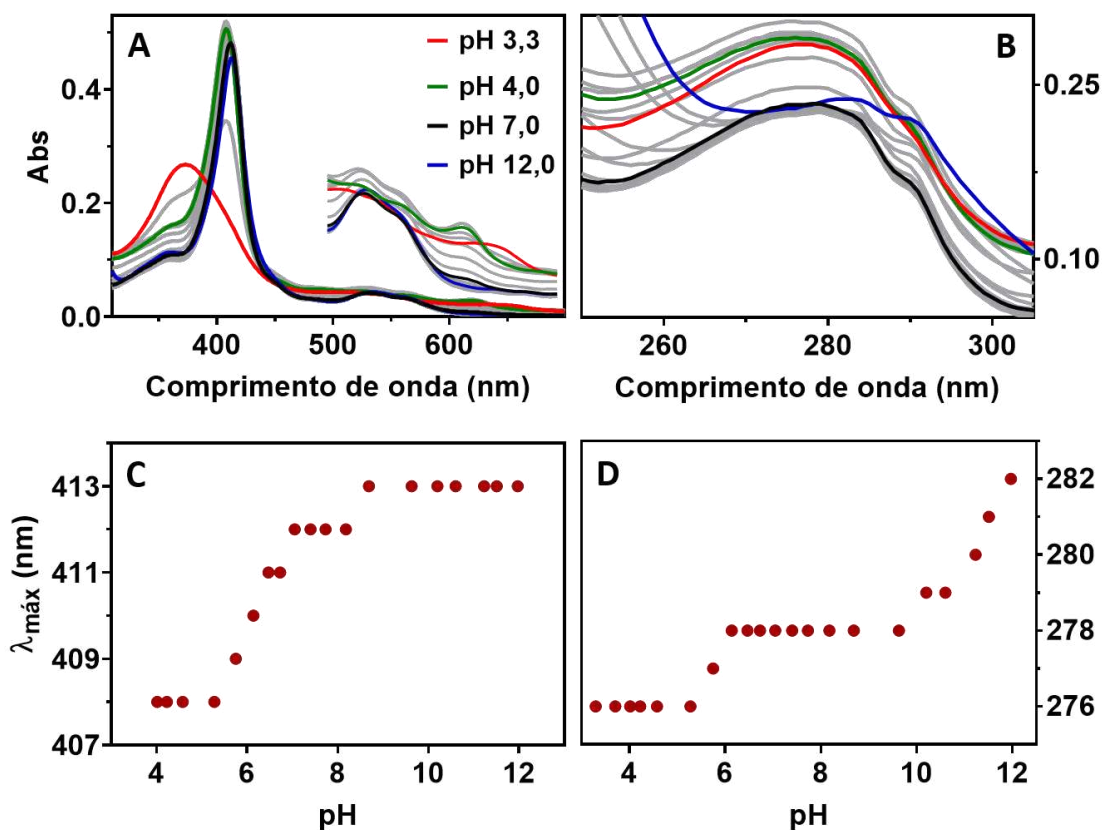
O microrganismo *M. infernorum* se desenvolve no interior de fendas termais, a cerca de 60 °C. Para termos informações que se correlacionem com essa alta resistência térmica do microrganismo, o estudo da estabilidade da HGbl mediante aquecimento foi realizado e monitorado por espectroscopia de dicroísmo circular, e complementarmente por espectroscopias de absorção eletrônica e fluorescência. Visando uma potencial aplicação catalítica da proteína, a investigação de sua estabilidade incluiu um estudo de seu comportamento em pHs variados e na presença de solventes orgânicos. Convém mencionar que tais estudos detalhados não foram publicados na literatura, havendo alguns dados de natureza mais qualitativa.

4.6.1. Estabilidade em diferentes valores de pH

Os resultados apresentados na seção anterior indicam que a acidificação do meio até pH 5,5 não causa grandes modificações na estrutura secundária da proteína, evidenciando sua alta estabilidade conformacional em meio ácido. De fato, essa estabilidade já havia sido atestada em relação a capacidade da HGbI manter seu grupo prostético em condições ácidas (ex. pH 4,6) durante longos períodos (cerca de 12 h) (TEH *et al.*, 2011), condição na qual muitas heme proteínas teriam o seu grupo heme dissociado.

A fim de realizar estes estudos, monitorou-se o espectro de absorção eletrônica da HGbI durante uma titulometria volumétrica por adição de ácido (Figura 10). Nesse estudo observa-se que mesmo em pH 4,0 o grupo heme encontra-se ligado a cadeia polipeptídica, tendo em vista a banda Soret e bandas Q características do grupo heme. Quanto à conformação global da proteína, sua estrutura terciária, é possível inferir a partir dos espectros de absorção eletrônica que há diferenças relacionadas a acidez do meio. De fato, entre os pHs 6,1 e 5,3 observa-se um deslocamento para o azul da banda em 278 nm, a qual é referente às absorções dos resíduos de aminoácidos aromáticos, principalmente tirosinas. Esse comportamento é indicativo da maior exposição desses resíduos ao solvente (SCHMID, 2001). Acima do pH 9,6, o deslocamento dessa banda para o vermelho pode indicar que a proteína está assumindo uma conformação cujos resíduos estão num ambiente menos polar, protegidos no interior da proteína. Embora esse possa ser um dos motivos, o mais provável é que esse efeito seja em decorrência da desprotonação dos grupos hidroxila das tirosinas, cujo pKa é 10,1 para o aminoácido livre. Em valores de pH mais elevados ($\geq 11,2$), o alargamento da banda de absorção no UV poderia sugerir que a proteína está experimentando um processo de desnaturação. Curiosamente, a banda Soret e as bandas Q, quando em pH 12,0 encontram-se praticamente idênticas àquelas observadas em pH 7,0, o que indica que o grupo heme encontra-se em seu sítio de ligação habitual na proteína. Esse perfil também descarta a formação do ligante hidróxido coordenado ao ferro(III) em altos pHs.

Figura 10 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl-Fe³⁺ (met), proteína na concentração de 5 μmol L⁻¹ em solução 100 mmol L⁻¹ NaCl a 25 °C durante titulação (pH 12,0 – 3,3). A) Espectros na faixa de comprimento de onda de 310 a 700 nm. B) Espectros na faixa de comprimento de onda de 250 a 310 nm. C) Variação do comprimento de onda máximo da banda Soret. D) Variação do comprimento de onda máximo da banda referente às transições eletrônicas dos resíduos de aminoácidos aromáticos (~280 nm).

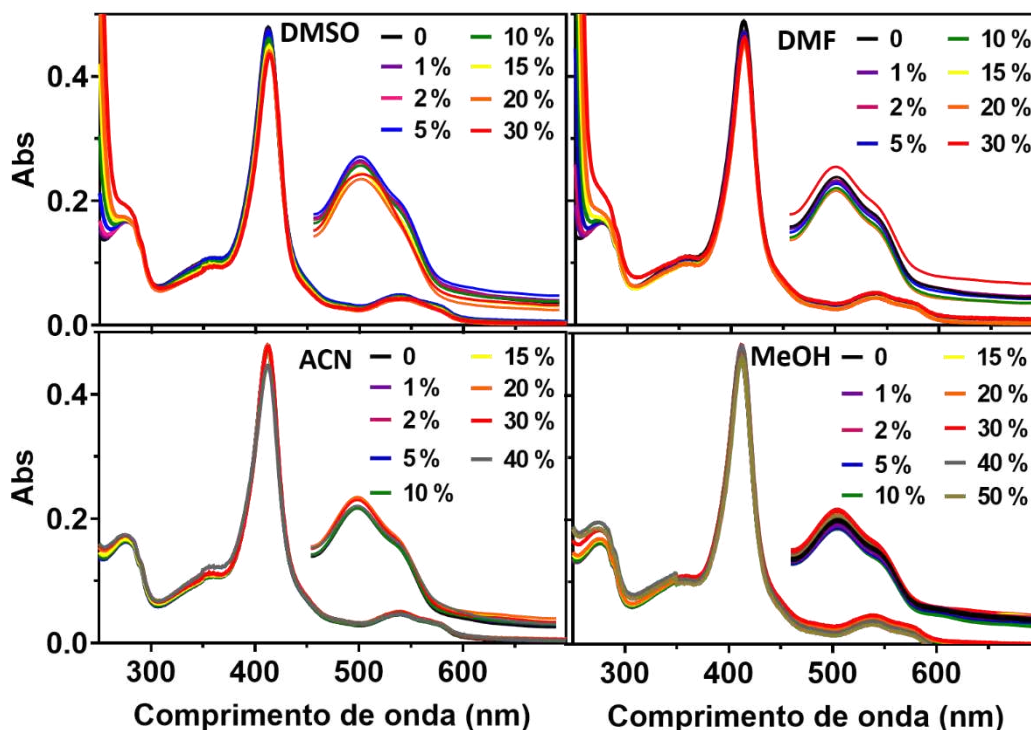


Fonte: o autor.

4.6.2. Estabilidade em solventes orgânicos

Muitas reações químicas de interesse científico e/ou comercial são catalisadas por enzimas e necessitam de solventes orgânicos para acontecer. Considerando o potencial emprego da HGbl como um biocatalisador, a estabilidade dessa proteína em alguns desses solventes orgânicos comuns foi monitorada por espectroscopia de absorção eletrônica.

Figura 11 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl-Fe³⁺ (met) em diferentes concentrações de solventes orgânicos – dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) – juntamente com tampão 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,4. Concentração da proteína igual a 5 μmol L⁻¹.



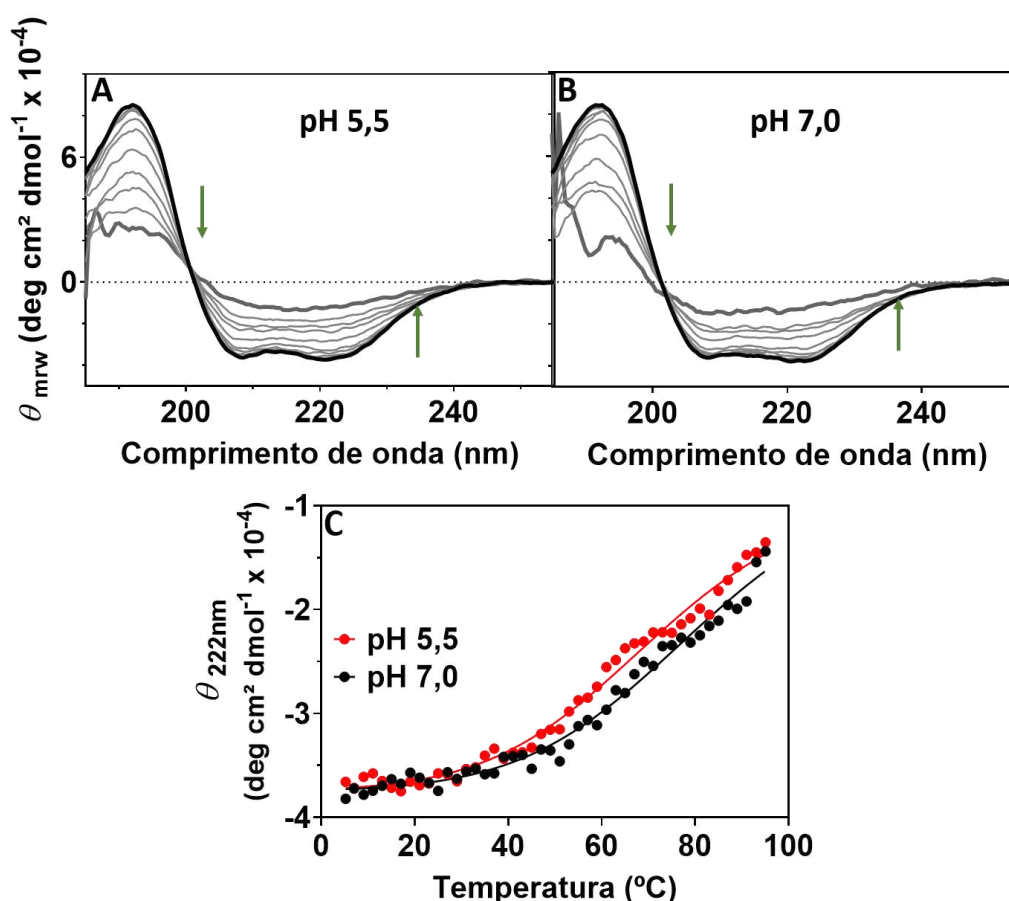
Fonte: o autor.

Os resultados, apresentados na figura 11, indicam que a proteína se mantém estável em concentrações variadas dependendo do solvente. No caso de dimetilsulfóxido e dimetilformamida, em até 30% de solvente orgânico não é observado nenhum sinal de precipitação da proteína e o grupo heme permanece ancorado a seu sítio de ligação, tendo em vista que a banda Soret e bandas Q permanecem sem alterações significativas. No caso de acetonitrila e metanol foi possível adicional uma concentração maior de solvente, 40 e 50%, respectivamente, sem alterar significativamente a estrutura da proteína. Esses resultados sugerem certa estabilidade da proteína em meio orgânico, apontando a possibilidade de empregá-la, por exemplo, na catálise de reações que dependam da presença desses solventes no meio reacional.

4.6.3. Estabilidade térmica

Na Figura 12-C são mostrados os perfis de variação da elipticidade a 222 nm com a temperatura. Enquanto que nas Figura 12-A e 12-B são mostrados os espectros obtidos a cada 10 °C de incremento de temperatura em pH 5,5 e 7,0, respectivamente.

Figura 12 - Desnaturação térmica da HGbl-Fe³⁺ (met) por dicroísmo circular. Cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de 2 μmol L⁻¹ em solução 10 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄. A) e B) são espectros de dicroísmo circular da HGbl-Fe³⁺ (met) na região do espectro entre 185 e 255 nm, coletados a cada 10°C de variação de temperatura, nos pH de 5,5 e 7,0, respectivamente. C) Perfis de desnaturação de 5 a 95 °C acompanhado por dicroísmo circular a 222 nm com elipticidades coletadas a cada 2 °C.



Fonte: o autor.

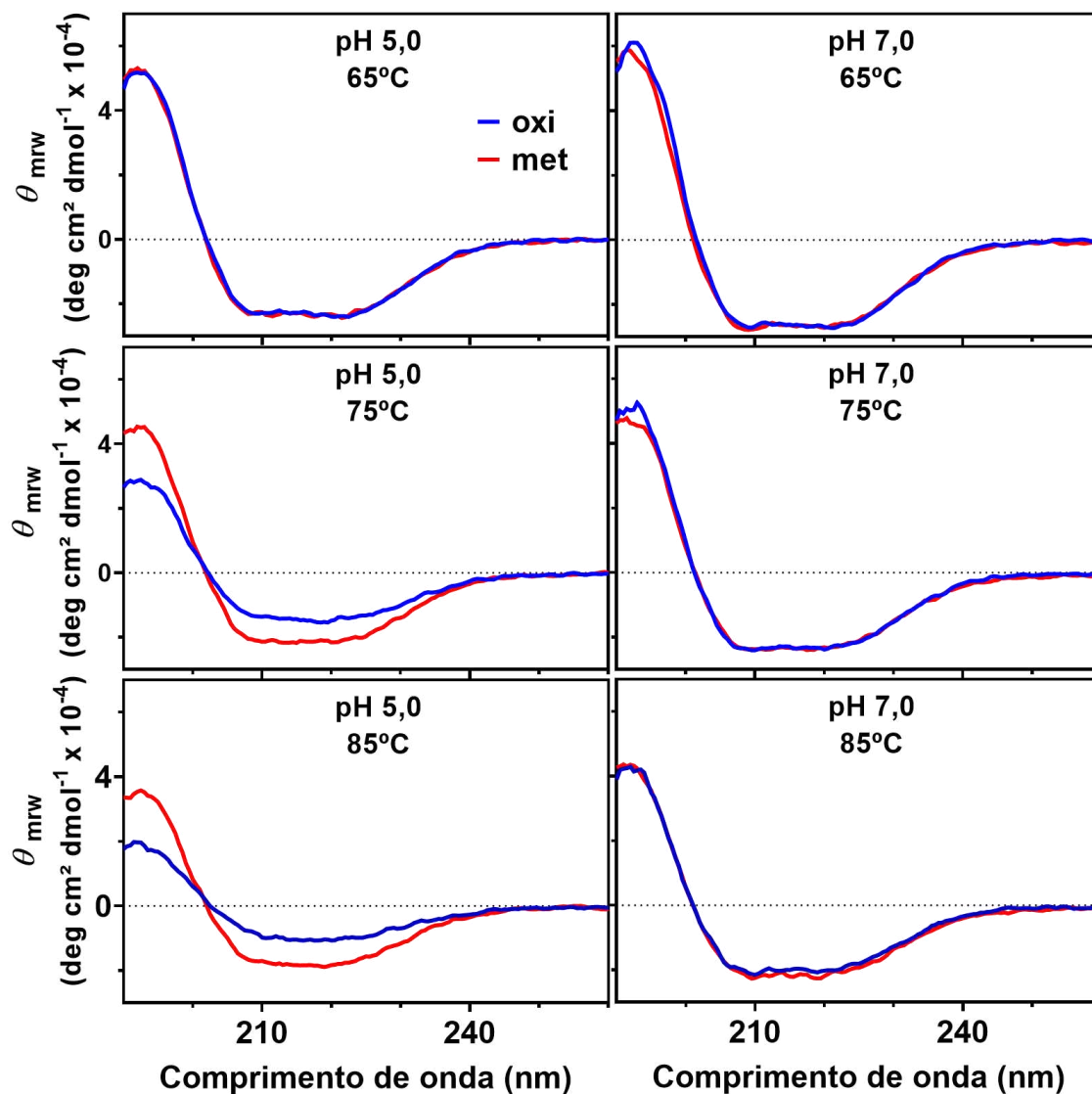
A técnica de dicroísmo circular tem sido amplamente empregada no acompanhamento de desnaturação de proteínas. No caso de desnaturação térmica quando a mudança espectroscópica observada é reversível, é possível se obter

parâmetros termodinâmicos, tais como temperatura média de desnaturação e ΔH do processo. O modelo mais simples de desnaturação é aquele que ocorre em dois estados, ou seja, a proteína migra de uma conformação totalmente enovelada para uma conformação totalmente desenovelada.

Os gráficos de elipticidade versus temperatura na Figura 12-C indicam que aparentemente a HGbl não passou por um processo completo de desenovelamento. Todavia, não são observados platôs bem definidos tanto nas temperaturas iniciais quanto nas temperaturas finais. Isso poderia indicar que a proteína não experimenta uma desnaturação simples, com um único processo ocorrendo, e ainda que o máximo de temperatura necessário para sua desnaturação não foi alcançado. Entretanto, os espectros apresentados na Figura 13 dão indícios que somente acima de 65 °C a estrutura secundária da proteína apresenta-se parcialmente desestruturada. De fato, o espectro obtido a 55 °C apresenta as bandas em 192, 208 e 222 nm com perda de intensidades de aproximadamente 10% em relação ao espectro a 25°C. Esse perfil evidencia a alta estabilidade térmica da HGbl, que está bem relacionada à temperatura a qual o microrganismo de origem está submetido em seu habitat natural.

Embora a desnaturação da HGbl aparente ser mais complexa do que um processo em apenas uma etapa (enovelada → desnaturada), foi feita uma tentativa de ajustar aos dados experimentais numa equação aplicada aos monômeros que sofrem esse tipo de desnaturação direta (sem estados intermediários). Para as duas condições de pH avaliadas os valores de R^2 foram de 0,988 e 0,983. A partir deste ajuste foram determinados os valores de temperatura média e entalpia de desnaturação. Em pH 5,5 esses valores foram de 71 °C e 13 kcal mol⁻¹; enquanto que em pH 7,0 de 81 °C e 12,9 kcal mol⁻¹. À primeira vista parece haver uma diferença significativa entre a estabilidade da proteína nos pH analisados, dada a diferença nas temperaturas médias de desnaturação ($\Delta=10^\circ\text{C}$). Entretanto, estatisticamente essa diferença é insignificante quando se leva em consideração o intervalo de confiança dessas temperaturas, que seriam 66–82 °C e 71–112 °C nos pHs 5,5 e 7,0, respectivamente.

Figura 13 - Desnaturação térmica da HGBI nas formas $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi) e Fe^{3+} (met). Espectros de Dicroísmo Circular nas temperaturas de 65, 75 e 85°C em pHs 7,0 e 5,0. Cubeta com caminho ótico de 0,1 cm, proteína na concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução 10 mmol L^{-1} PBS.



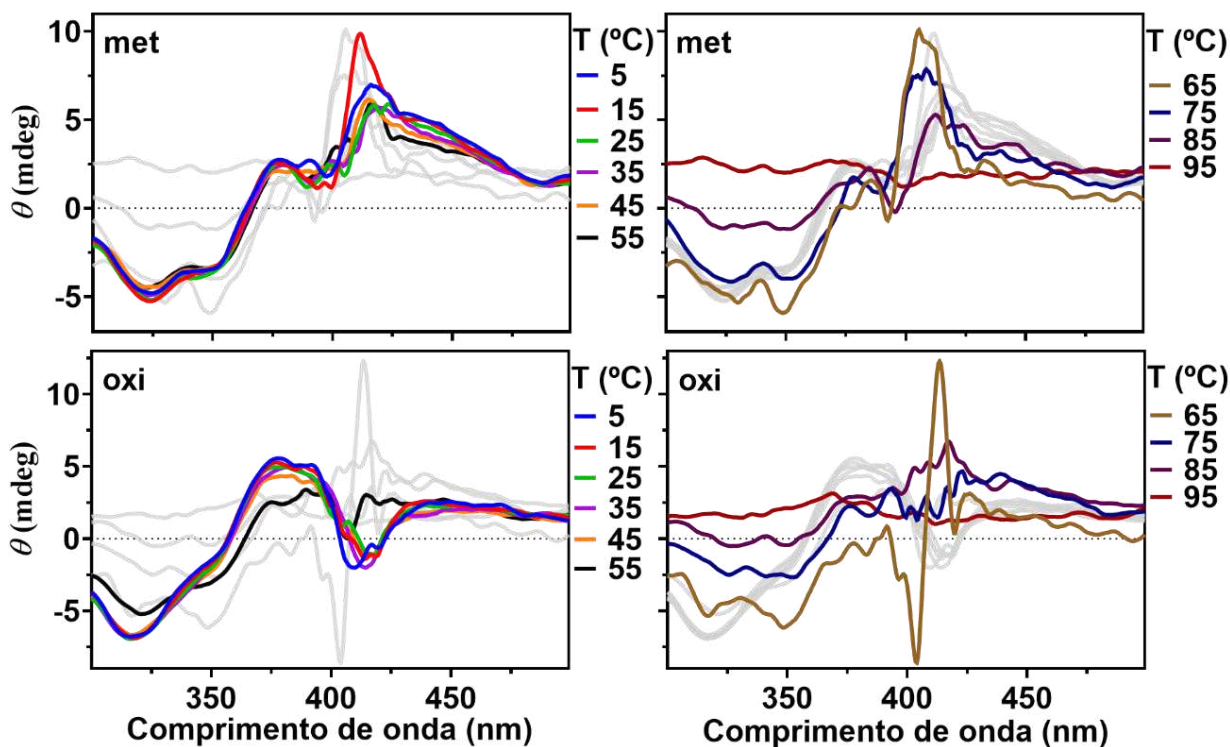
Fonte: o autor.

Com o objetivo de investigar possíveis efeitos do estado de oxidação da proteína em sua estabilidade, realizou-se a desnaturação térmica da HGBI- $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi). A equação utilizada anteriormente (para a forma met) não se ajustou bem aos dados experimentais, sobretudo para o pH 7,0. Apesar disso, é possível observar uma diferença marcante nos espectros apresentado na Figura 13 entre os dois estados da proteína em pH 5,0 na temperatura de 75°C. Em meio ácido verifica-se que a proteína

reduzida está mais sujeita à perda estrutural frente às temperaturas mais elevadas. De fato, quando se estima a estrutura secundária da HgbI submetendo os espectros ao programa BestSel, em pH 5,0 se observa uma diminuição nas α -hélices de 60,4 para 27,0% na proteína reduzida quando se passa de 65 para 75°C, enquanto que no estado oxidado essa mudança é de apenas de 57,8 para 45,5%. Na temperatura de 85°C verifica-se uma diferença ainda maior entre as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} , 8,8 e 26,9% de α -hélices remanescentes, respectivamente.

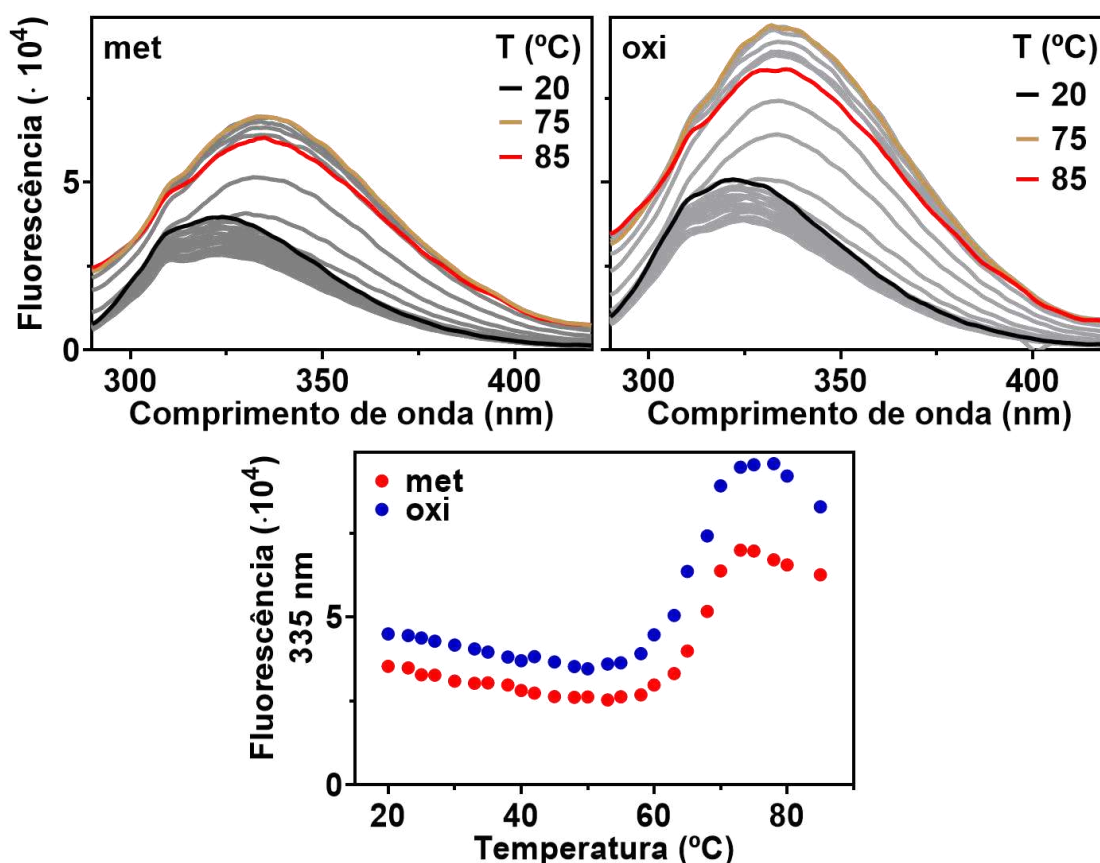
Complementarmente, utilizou-se a técnica de dicroísmo circular para investigar o processo de desnaturação térmica acompanhando a banda Soret (Figura 14), que é sensível às mudanças no microambiente do grupo heme. Já a técnica de fluorescência foi utilizada com objetivo de investigar as alterações sofridas na estrutura terciária da proteína quando esta é submetida a aquecimento (Figura 15).

Figura 14 - Desnaturação térmica da HgbI nas formas Fe^{3+} (met) e $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi). Espectros de Dicroísmo Circular na faixa de 300 a 500 nm. Variação de temperatura de 5 a 95°C, a 1°C min^{-1} . Cubeta com caminho ótico de 1 cm. Proteína na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 100mmol L^{-1} PBS, 100mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4.



Fonte: o autor.

Figura 15 - Desnaturação térmica da HGbI nas formas Fe^{3+} (met) e $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (oxi). Espectros de Emissão de Florescência na faixa de 290 a 420 nm, com excitação em 280 nm. Variação de temperatura de 20 a 85°C, a 1°C min^{-1} . Cubeta com caminho ótico de 1 cm. Proteína na concentração de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4.



Fonte: o autor.

Ao se analisar cuidadosamente os espectros de dicroísmo circular, podemos observar indícios de que a forma oxi passaria por uma modificação conformacional mais pronunciada quando a temperatura atinge 55°C, comparativamente à forma met. Mesmo nas temperaturas mais elevadas (65 e 75°C) as diferenças espectrais mais sutis observadas para proteína a oxidada (met) indicam sua estabilidade superior em relação à HGbI oxi. O perfil espectral da HGbI pela técnica de absorção eletrônica sugere que seu centro metálico oxidado (Fe^{3+}) encontra-se coordenado a um ligante interno (resíduo de aminoácido) na sua posição distal. A maior estabilidade em relação ao grupo heme e seu microambiente pode ser associada a dificuldade em remover o grupo heme hexacoordenado com resíduos endógenos à cadeia polipeptídica.

O monitoramento da fluorescência intrínseca da HGbl submetida ao processo de aquecimento também indica maior estabilidade da proteína oxidada. O deslocamento da banda de fluorescência para o vermelho e o incremento da intensidade são indicativos que os grupos fluoróforos estão mais expostos ao solvente polar, em decorrência da quebra das interações intermoleculares na proteína. O aumento da fluorescência como resultado do aumento na temperatura é mais pronunciado para HGbl oxi. Já o deslocamento do máximo e alargamento da banda começa a ser perceptível a 60 e 63°C para as formas oxi e met, respectivamente. É importante salientar que há um erro de temperatura médio nesse experimento, decorrente do ineficiente sistema de isolamento térmico, o que indica na cubeta até 5°C mais baixa que a temperatura indicada no banho termostático. Todavia, as mesmas condições foram aplicadas em ambas as amostras analisadas, de modo que, para fins comparativos os resultados são confiáveis, apesar de que os valores absolutos não são exatos.

De maneira ampla, os resultados obtidos demonstram que a HGbl, quando em sua forma Fe^{3+} , apresenta maior estabilidade térmica tanto em relação a conservação de sua estrutura terciária e estabilidade do grupo heme, quanto em relação a sua estrutura secundária. Wensien e colaboradores observaram um efeito análogo na estabilidade de NgTAL, uma enzima transaldolase do patógeno *Neisseria gonorrhoeae*, que após ser reduzida mostrou-se mais cooperativa frente a desnaturação térmica (WENSIEN *et al.*, 2021). É importante salientar que NgTAL não apresenta centro metálico, e a principal diferença entre as formas oxidada e reduzida seria a presença de uma ligação covalente entre uma cisteína e lisina observada unicamente na forma oxidada. Embora a estabilidade da HGbl possa estar associada a uma mudança estrutural decorrente do estado de oxidação do centro metálico, não se pode descartar que seja efeito da formação de uma ligação covalente envolvendo sua única cisteína e outro aminoácido, ou mesmo entre cisteínas de subunidades diferentes. Xia e colaboradores demonstraram o aumento da estabilidade mecânica da proteína GB1 quando um centro metálico de cobalto é inserido. O átomo de Co, que se liga à proteína por dois resíduos de histidina, pode se apresentar nas formas Co^{2+} e Co^{3+} ; contudo, o incremento na estabilidade é drasticamente mais pronunciado na forma oxidada. Esse efeito é atribuído a maior estabilidade termodinâmica e inércia cinética dos complexos de Co^{3+} (XIA; ZUO; LI, 2019). No caso do centro metálico da

HGbl, apenas a forma oxidada, Fe^{3+} , pode estar ligada a dois resíduos de aminoácidos da proteína, já que a forma reduzida se liga a um ligante externo (O_2). Dessa forma, a maior resistência a temperatura poderia ser em decorrência da estabilidade que essa ligação causaria.

4.7. Remoção do grupo Heme

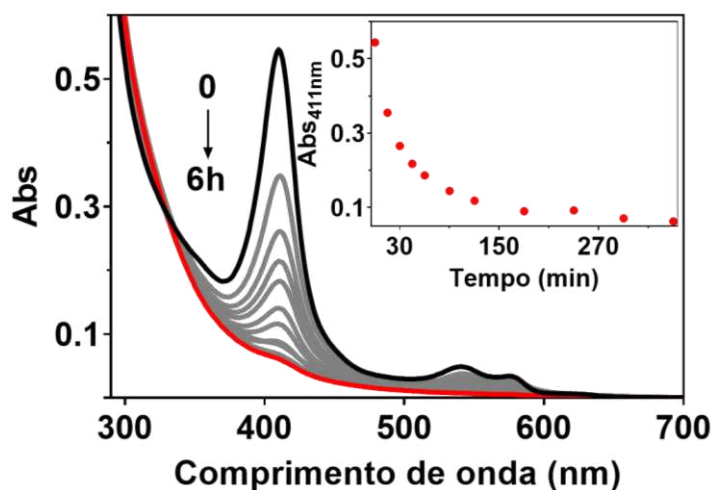
O interesse em obter *apo* proteínas muitas vezes se deve a possibilidade de inserção de um grupo prostético não-natural no lugar do grupo removido. Metaloproteínas com novas atividades, em especial atividades catalíticas, têm sido desenvolvidas graças à inserção de complexos metálicos à sua estrutura (REETZ, 2019; WIESZCZYCKA; STASZAK, 2017; WOLF; VARGAS; LEHNERT, 2017), . Trabalhos nesse sentido têm possibilitado o desenvolvimento de novos biocatalisadores com velocidade, enantioseletividade e diastereoseletividade superiores àquelas conseguidas por catalisadores puramente inorgânicos ou mesmo enzimas nativas (HASEGAWA; LEHNERT; HAYASHI, 2017; WARD, 2016).

A obtenção de hemoproteínas em sua forma *apo* pode ser conseguida, geralmente, de duas maneiras: i) pela produção da proteína já sem o grupo prostético, o que requer condições especiais de crescimento celular (ZHANG *et al.*, 2011) ou uso de mutante (RIBEIRO *et al.*, 2003); ou ii) pela remoção do grupo prostético da *holo* proteína já isolada. A estratégia mais comum de remoção do grupo heme envolve a desnaturação da proteína mediante acidificação do meio, seguida de extração do heme livre por um solvente orgânico, e posterior renaturação da proteína após neutralização do ácido em solução e remoção do solvente orgânico (LEWIS, 1954; TEALE, 1959). Recentemente, outros métodos menos danosos vêm sendo usados, em especial aqueles que não envolvem solventes orgânicos (SCHMIDT *et al.*, 2003), muitas vezes incompatíveis com a proteína.

Nesse trabalho, empregou-se o método de remoção do heme com detergente Tween20 (SCHMIDT *et al.*, 2003). A proteína HGbl foi submetida a encubação em tampão Tris·HCl pH 8,0 com 10% Tween20 a 37°C e 50 rpm. Esse procedimento foi otimizado quanto a concentração de detergente, temperatura e velocidade de agitação. No procedimento original, aplicado para sGC (guanilato ciclase solúvel) (SCHMIDT *et al.*,

2003), a proteína foi encubada por 15 min com 2% de Tween20. Durante o período de encubação são adquiridos espectros eletrônicos no UV-Vis com o objetivo de monitorar o processo de remoção do heme, que é confirmado pela diminuição da sua absorbância. Observamos que com essa concentração de detergente, mesmo após horas, surgia uma banda pronunciada na região da Soret. Foram testadas as concentrações de 5% e 10% de Tween20, e verificou-se que apenas na concentração mais elevada a remoção do heme foi completa. Estabelecida a concentração de detergente a ser usada, foi feita uma tentativa de remoção do heme com incubação em temperatura mais branda (~16°C). Foi observado que mesmo após 16 horas a proteína manteve seu grupo prostético. Dessa forma optou-se por manter a temperatura em 37°C. Quanto a agitação, optou-se por uma agitação mais suave que aquela usada no trabalho referência, 50 rpm ao invés de 300 rpm. A agitação intensa promoveria a perda de matéria devido à formação de bolhas, além do risco de desnaturação da proteína por choque mecânico. Na Figura 16 é possível observar a diminuição gradativa com tempo tanto da banda Soret, quanto das bandas Q (520 a 590 nm). Já após 3 horas de extração observa-se uma estabilização nos valores de absorbância, e praticamente a completa ausência da banda Soret e bandas Q.

Figura 16 - Espectros eletrônicos na região do UV-Vis da proteína HgbI, obtidos em diferentes tempos durante a incubação com 10% Tween20 a 37°C. A variação da absorbância da banda Soret com o tempo é mostrada no detalhe.

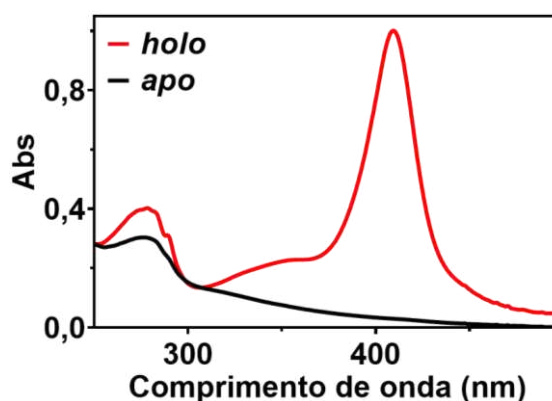


Fonte: o autor.

A amostra incubada foi diluída 4 vezes em tampão Tris·HCl pH 8,0, e aplicada na coluna Q-Sepharose, a qual foi lavada com o mesmo tampão até total remoção do detergente. Em seguida a proteína foi eluída com tampão Tris·HCl pH 7,3 contendo 300 mmol L⁻¹ NaCl. A separação do grupo heme, detergente e apo HgbI necessitou o uso dessa coluna, por se tratar de uma troca aniônica, contendo um grupo catiônico forte (-CH₂N⁺(CH₃)₃). Desta forma, em tampão sem NaCl, tanto a fração protéica quanto o heme livre devem ficar presos ao grupo iônico da coluna. Todavia, quando é realizada a lavagem com 300 mmol L⁻¹ NaCl, a proteína deve ser prontamente eluída, ao passo que o grupo heme fica retido, por ter uma afinidade ainda muito maior pela coluna. Em seguida, a amostra foi submetida a diálises sucessivas, e, posteriormente, a troca de tampão usando ultraconcentrador (Centricon®). A amostra concentrada foi então submetida a uma sequência de medidas, tais como espectroscopia eletrônica no UV-Vis, dicroísmo circular e fluorescência. A concentração da proteína foi estimada a partir da absorvância em 280 nm.

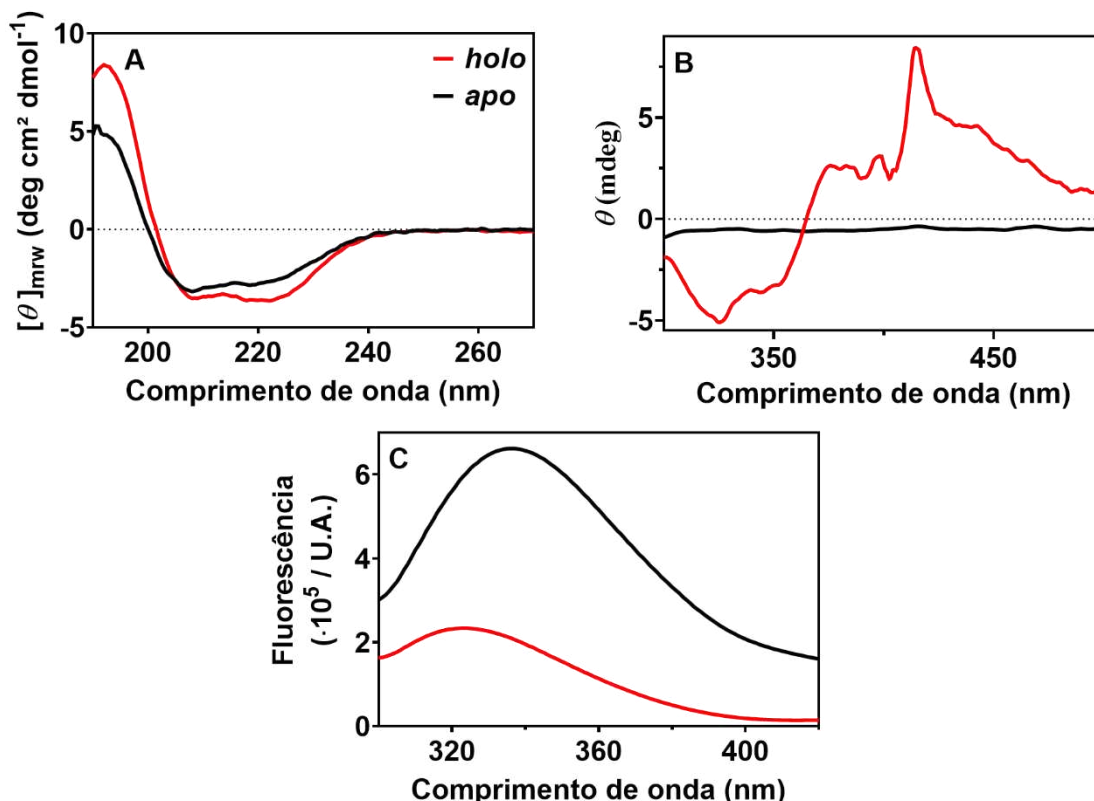
De acordo com o espectro eletrônico, aparentemente, o heme foi removido de forma eficiente, tendo em vista que não há banda *Soret* mensurável. Ainda assim, a proteína manteve-se minimamente estruturada, dado a ausência de perturbações no máximo da banda em 280 nm, como pode ser visto na figura 17.

Figura 17 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HgbI em suas formas apo e holo.



Na Figura 18-A e 18-B são mostrados os espectros de dicroísmo circular da HgbI em suas formas *apo* e *holo*. Os espectros na região do ultravioleta distante e visível foram obtidos com a HgbI nas concentrações de 2 e 20 μmol L⁻¹, respectivamente, ambos em tampão 10 mmol L⁻¹ fosfato pH 7,0.

Figura 18 - Espectros da HGbI em suas formas apo e holo. A) dicroísmo circular na região do ultravioleta distante, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. B) dicroísmo circular na região do ultravioleta próximo, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. C) fluorescência com excitação em 280 nm, 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína. Tampão 10 mmol L^{-1} fosfato pH 7,0.



Fonte: o autor.

De acordo com os espectros de dicroísmo circular na região de 190 a 270 nm, a proteína tem parte da sua estrutura secundária perturbada quando o grupo prostético é removido. A moderada mudança no perfil do espectro e a diminuição nas intensidades das bandas em 222 e 192 nm indicam que a HGbI já não mais se organiza quase que exclusivamente em α -hélices. A submissão do espectro de dicroísmo ao programa BestSel indica que 76% da estrutura da apo proteína organiza-se em α -hélices (96% na holo proteína), enquanto que o restante da cadeia polipeptídica assume estruturas aleatórias. Diversos trabalhos na literatura relatam efeitos similares na formação de apo-proteína derivadas da remoção do grupo heme. Huntley e Strittmatter estudaram o efeito da ligação do heme ao citocromo b_5 por diversas técnicas, incluindo dicroísmo circular. Nesse trabalho foi observado que a ligação do grupo prostético a apo-proteína confere uma estrutura com menos

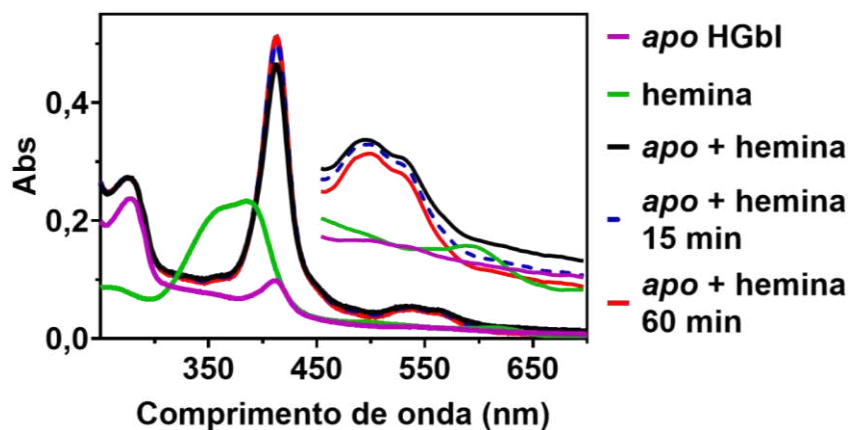
desordenamento (HUNTLEY; STRITTMATTER, 1972). Tang e colaboradores relataram, utilizando dicróismo circular, uma perda relativa de mais de 12% nas α -hélices que compõem a estrutura da Aminoacilase quando o centro metálico Zn^{2+} é removido (TANG *et al.*, 1995). De forma análoga, D'Anna e Tollin observaram que a ligação de flavina a flavoproteínas em sua forma apo é acompanhada de mudanças na estrutura secundária (D'ANNA; TOLLIN, 1972). É difícil determinar se a ausência do grupo heme ou o processo de remoção é o único a provocar as mudanças observadas. Estudos utilizando cálculos computacionais simulando a remoção do heme podem auxiliar no entendimento deste processo. Com respeito a região do visível (Figura 18-B) é possível inferir que a remoção do heme foi completa, dado a ausência de bandas nessa faixa do espectro.

Complementarmente, foram obtidos os espectros de fluorescência da HgbI apo (Figura 18-C). A fluorescência intrínseca de proteínas se deve a seus aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano (HUNTLEY; STRITTMATTER, 1972). O principal efeito observado na fluorescência foi o aumento na intensidade quando o grupo heme é removido. Ao se excitar uma molécula ou parte de uma molécula, essa energia absorvida pode ser emitida ou dissipada de diferentes formas. Uma forma bastante comum de dissipação é a transferência dessa energia para certos grupos ligados a essa molécula, que apresentam bandas de absorção justamente no comprimento de onda em que ocorreria a emissão (LAKOWICZ, 1999). O grupo heme é conhecido por ser um supressor da emissão intrínseca de proteínas, ainda mais particularmente por conter íon paramagnético (Fe^{3+}) (HIRSCH, 2002). Nos espectros apresentados acima, fica evidenciado o efeito supressor que o heme realiza sobre a emissão da proteína. Além disso, o deslocamento da banda para maiores comprimentos de onda quando a proteína *apo* é formada (de 323 nm para 336 nm), pode significar uma estrutura relativamente mais aberta, com aminoácidos aromáticos mais expostos. Nessa configuração a energia pode ser dissipada por modos vibracionais do solvente sob choque, no caso a água. Esse deslocamento para menores energias se deve a estabilização do estado excitado pelas moléculas polares do solvente (LAKOWICZ, 1999).

4.7.1. Reinserção do grupo heme

Com objetivo de verificar a capacidade da *apo* proteína ligar-se a um novo grupo prostético, a mesma foi mantida sob incubação com hemina (protoporfirina IX-Fe-Cl) e seus espectros de absorção eletrônica foram coletados (Figura 19).

Figura 19 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da *apo* HGbI antes e após incubação com hemina.



Fonte: o autor.

O espectro obtido logo após a adição de hemina à solução contendo a *apo* HGbI indica que a inserção do grupo ao sítio de ligação na proteína é imediata. A banda Soret em 412 e banda Q com máximo em 532 indicam que a proteína na forma met (HGbI-Fe³⁺) foi obtida.

Como tentativa de inserção de grupo prostético não natural, incubou-se a *apo* proteína com uma ftalocianina de níquel (ftalocianina ácido tetrassulfônico de níquel II). Os resultados obtidos (anexos) mostraram que não ocorreu a incorporação desse complexo na cadeia proteica. Tal resultado pode ser justificado pelas diferenças estruturais, sobretudo em relação ao tamanho desses compostos, grupo heme, naturalmente presente na HGbI e a complexo de níquel em questão.

São necessárias tentativas adicionais de ancoramento de moléculas análogos ao grupo heme à HGbI, principalmente moléculas que já mostraram potencial como cofatores em proteínas biocatalisadoras. Alguns exemplos seriam Mn-porficeno (OOHORA *et al.*, 2013), aplicado em reações de hidroxilação e sulfoxidação, Mn-clorina

(GUO *et al.*, 2022), em reações de peroxidase, e Ir-porfirina (KEY *et al.*, 2016), usada na inserção de carbenos em ligações C-H.

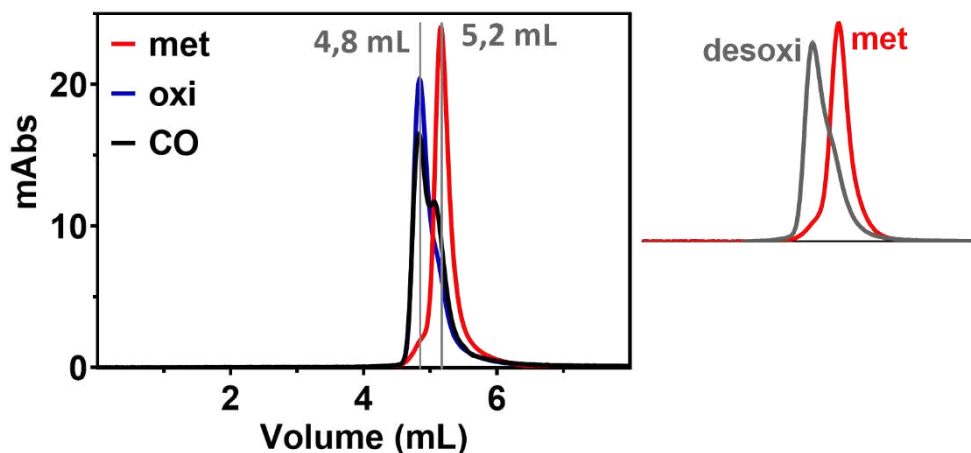
4.8. Oligomerização versus Estado de oxidação

A forma que as proteínas assumem é influenciada fortemente por efeitos hidrofóbicos. De modo geral o arranjo adotado deve minimizar o contato dos resíduos apolares com o solvente, ao mesmo tempo em que favorece a interação destes entre si no interior da proteína (OUELLETTE; RAWN, 2015). Apesar do arranjo globular ser o mais comum, algumas proteínas podem ser alongadas (ERICKSON, 2009). Não é raro que proteínas globulares formem uma estrutura quaternária por meio da associação de subunidades mantidas unidas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Um exemplo bem conhecido é a hemoglobina, que forma um homotetrâmero (quatro subunidades idênticas). Cada subunidade possui suas próprias estruturas primária, secundária e terciária, e as funções da proteína dependem do perfeito arranjo da estrutura quaternária.

A técnica de filtração em gel analítica pode ser bastante elucidativa sobre o estado de oligomerização nativo da proteína, além de permitir a investigação de mudanças conformacionais. Com intuito de entender como a HGbI se organiza quanto a sua estrutura quaternária, foram feitos ensaios de filtração em gel em diferentes condições.

Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas para HGbI nas formas met, oxi, ligada a CO e deoxi (*inset*) em pH 7,0. A característica mais marcante observada seria que as formas reduzidas (oxi, CO e desoxi) apresentam picos com volume de retenção menores que a forma oxidada (met). Isso significa que, quando reduzida, a proteína assume possivelmente uma “conformação menos compacta”. Embora seja observado “ombros” nos picos cromatográficos das formas reduzidas, sobretudo para HGbI-Fe²⁺-CO, os máximos coincidem exatamente no mesmo volume de retenção, 4,8 mL, enquanto que para HGbI-Fe³⁺ o máximo do pico ocorre em 5,2 mL.

Figura 20 - Cromatogramas da HgbI nas formas met (Fe^{3+}), oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) e CO ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$) com acompanhamento em 412 nm. $[\text{HgbI}] = 2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,0. Inset: comparação entre formas desoxi (Fe^{2+}) e met.



Fonte: o autor.

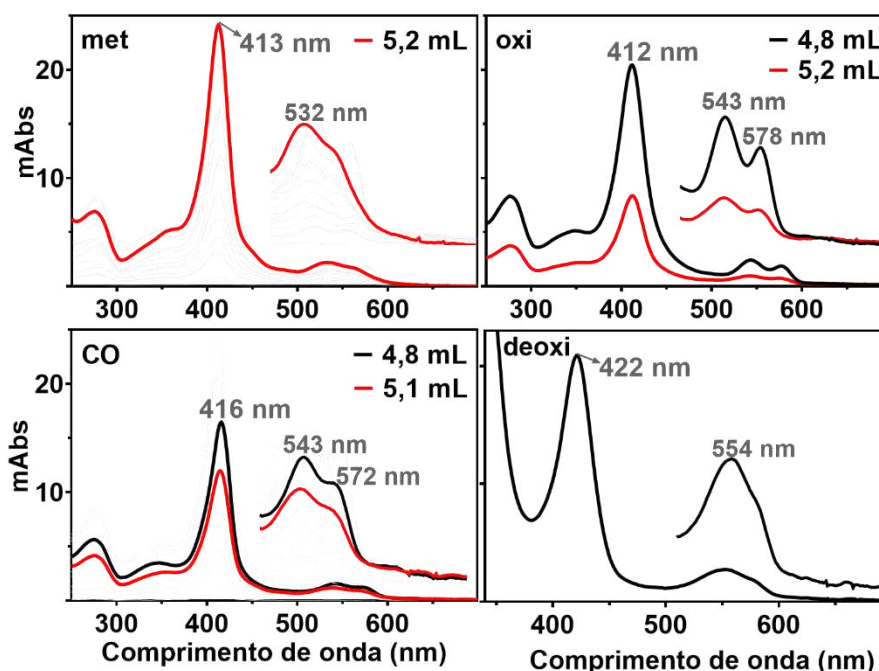
Figura 21 - Cromatogramas deconvoluídos da HgbI oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) e ligada a CO ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$) em pH 7,0.



Fonte: o autor.

À primeira vista, há indícios de que mudanças conformacionais da proteína são governadas pelo estado de oxidação de seu centro metálico, e a natureza do ligante distal é pouco relevante quanto a tais mudanças. Os espectros de UV-Vis apresentados na Figura 22 indicam que a proteína foi obtida nas formas indicadas. Além disso, é possível perceber que espectros referentes aos ombros que aparecem nos cromatogramas das formas oxi e CO são semelhantes aos espectros referentes aos picos principais. Dessa forma, tem-se indícios que estas formas reduzidas apresentam pelo menos dois tipos de população quanto ao tamanho.

Figura 22 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes as amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 21.



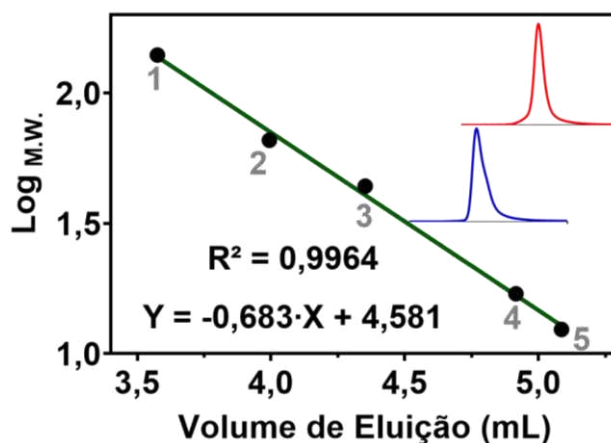
Fonte: o autor.

Numa tentativa de entender a natureza oligomérica da HgbI foram contruídas curvas de calibração com proteínas globulares de diferentes massas moleculares, especificamente, FixL de *Rhizobium etli* (140 KDa, forma dimérica), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo (45 KDa), mioglobina (17 KDa) e citocromo *c* (12 KDa). A curva linear obtida se ajustou bem aos dados experimentais em todos os pH analisados (5,5 – 7,4), com $R^2 > 0,99$. Na figura 23 está apresentada a curva de calibração para o pH 7,4. Os cromatogramas da HgbI nas formas met e oxi nesse pH são apresentados de modo a ilustrar sua posição na curva de calibração.

Quando os tempos de retenção dos picos cromatograficos da HgbI são aplicados à equação da reta os valores de massa encontrados são de 12,8 e 17,0 kDa para as formas met e oxi, respectivamente. Embora os valores encontrados não possam ser relacionados diretamente a formas oligoméricas bem definidas (monômero e dímero, por exemplo), a diferença entre as massas encontradas e a reprodutibilidade do experimento, indicam claramente que há uma mudança na estrutura terciária/quartenária da proteína dependente do estado de oxidação. A incongruência entre as massas encontradas e um possível estado de oligomerização

pode ser devido a pouca acurácia da coluna de filtração utilizada, sobretudo na análise de proteínas com massas menores, entretanto, não podemos plenamente descartar uma mudança conformacional sem oligomerização.

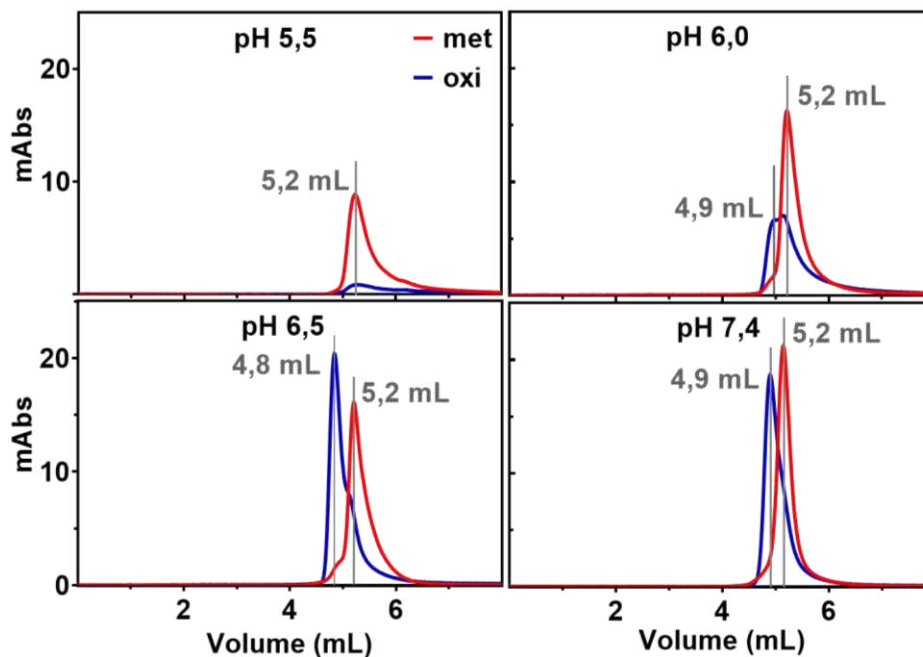
Figura 23 - Curva de calibração com diferentes proteínas na filtração em gel. Fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4. 1- ReFixL, 2- BSA, 3- Ovoalbumina, 4- Mioglobina e 5- Citocromo c. Inset: cromatogramas da HGbI met (—) e oxi (—).



Fonte: o autor.

Dada a possível diferença conformacional observada entre os estados oxidado e reduzido da HGbI, o efeito que o pH tem sobre essas diferentes conformações foi também analisado através de filtração em gel. Os resultados encontrados mostraram-se bastante interessantes como discutidos a seguir, mas, deve-se levar em consideração a limitação de faixa de pH permitido para uso dessa coluna, o que restringiu um pouco os estudos (Figura 24). Aparentemente, quando a proteína se encontra em sua forma reduzida ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) esta assume uma conformação mais desestruturada em pH mais baixos, o que não acontece com a forma oxidada (Fe^{3+}). Em pH 5,5 a forma oxi não apresenta um pico bem definido, enquanto que em pH 6,0, o perfil cromatográfico observado para a HGbI reduzida é bastante diferente daqueles vistos em condições mais próxima da neutralidade. Já a proteína oxidada (Fe^{3+}), embora tenha um volume de eluição um pouco maior na condição mais ácida, apresenta um perfil cromatográfico semelhante nas condições analisadas.

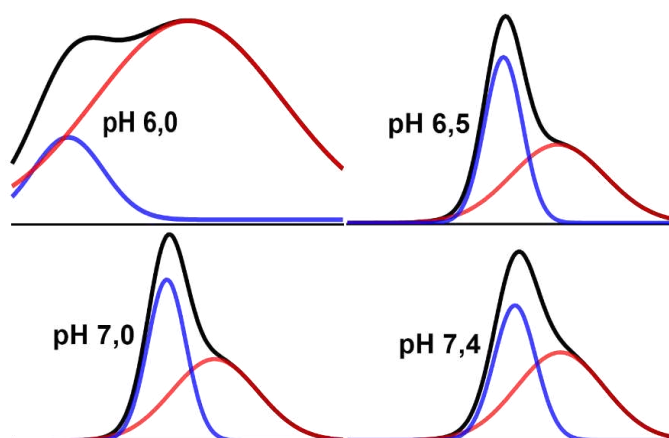
Figura 24 - Cromatogramas da HgbI nas formas met (Fe^{3+}) e oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) em diferentes pH. $[\text{HgbI}] = 2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl.



Fonte: o autor.

Outro aspecto interessante a ser destacado é que a amostra reduzida possui um perfil cromatográfico que sugere a presença de dois tipos de populações oligoméricas ou conformações distintas em quantidades apreciáveis. Isso fica ainda mais evidenciado quando são feitas deconvoluções dos cromatogramas obtidos (Figura 25).

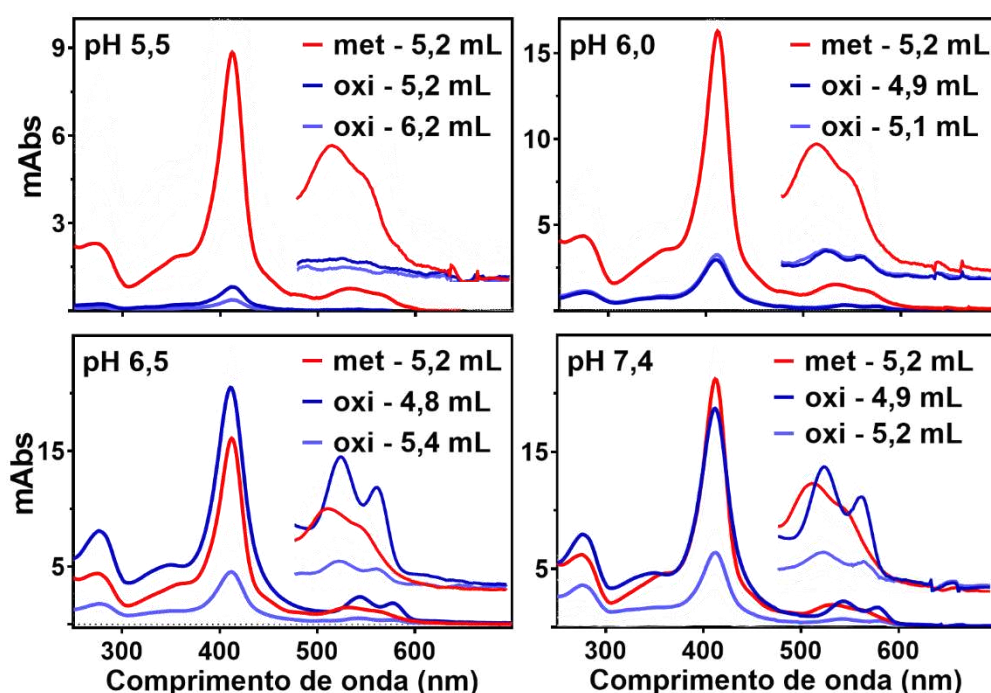
Figura 25 - Cromatogramas deconvoluídos da HgbI oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) em diferentes pH.



Fonte: o autor.

Analisando as áreas dos picos deconvoluídos, observa-se que nos pHs 6,5 e 7,0 o percentual da área do pico referente a forma oligomérica (ou conformação alongada) é de 47%. Em pH 7,4 esse percentual é de 43%. A deconvolução do cromatograma referente ao pH 6,0 não se ajustou bem aos dados experimentais, embora seja perceptível que nesse pH prevaleça o monômero (ou espécie globular).

Figura 26 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes às amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 24.



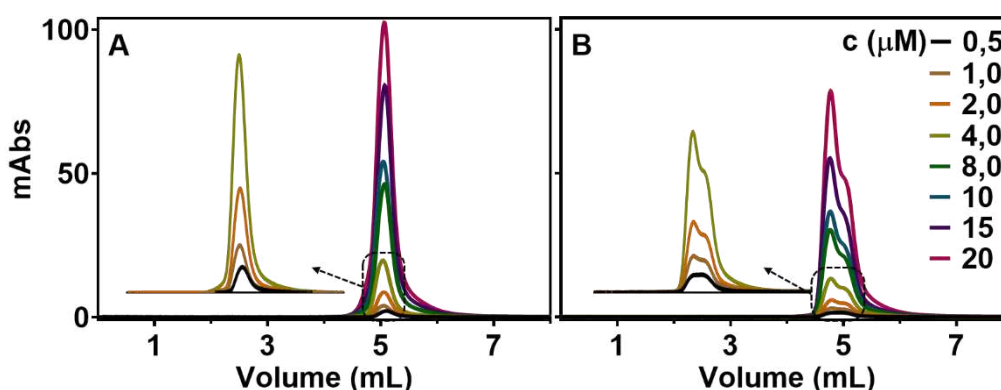
Fonte: o autor.

O efeito do pH sobre o estado de oligomerização (ou confôrmero) e estado de oxidação da HGbI não parece ser simples. Claramente a formação de um estado oligomérico (ou conformacional) mais complexo da HGbI, provavelmente um dímero, acontece quando a proteína está reduzida, e sua oxidação impede a formação desse estado. Interessante mencionar que dados preliminares de RMN da proteína HGbI marcada (^{13}C e ^{15}N) indicam possivelmente formação de dímero na forma reduzida (Fe^{2+}) devido ao aumento expressivo de sinais impossibilitando sua resolução. Entretanto, na forma oxidada (Fe^{3+}) é possível obter sinais no RMN bem resolvidos sendo capaz, inclusive, de levar a sua atribuição (*dados ainda não publicados, relatos

experimentais do prof Eduardo Sousa). Há evidências de que pHs mais baixos dificultem a formação do dímero. Contudo, não se pode dizer que o prevalecimento do monômero em meio ácido seja consequência exclusiva da oxidação da proteína, já que os perfis cromatográficos apresentados para a proteína met e oxi não se assemelham. Com base nos dados aqui coletados, na faixa de pH estudado, a forma met controla uma estrutura monomérica (ou globular), enquanto que as formas reduzidas estabelecem diferentes conformações/oligomerizações dependendo do pH.

A formação de oligômeros está intimamente relacionada a concentração da proteína. O aumento da concentração normalmente favorece a interação entre as cadeias polipeptídicas e conseqüentemente a formação de estados oligoméricos maiores. Pensando nisso, a influência da concentração no estado de oligomerização da HgbI foi acessada por meio de filtração em gel (Figura 27). Como é possível observar na Figura 27-A, para a proteína em sua forma met (Fe^{3+}) variações na sua concentração praticamente não influenciam no seu “tamanho”, tendo em vista que o perfil cromatográfico não varia. Por outro lado, como pode ser observado na Figura 27-B, o mesmo não acontece com a oxi HgbI ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$). Como visto anteriormente, quando reduzida, a proteína assume possivelmente uma conformação maior que aquela da proteína oxidada ou um estado dimérico. Esse estado superior é favorecido em concentrações maiores, dado o aumento relativo do pico em menor volume de eluição (4,8 mL) em relação ao ombro em maior volume de eluição (5,2 mL). Esse resultado reforça a possível formação de uma espécie dimérica.

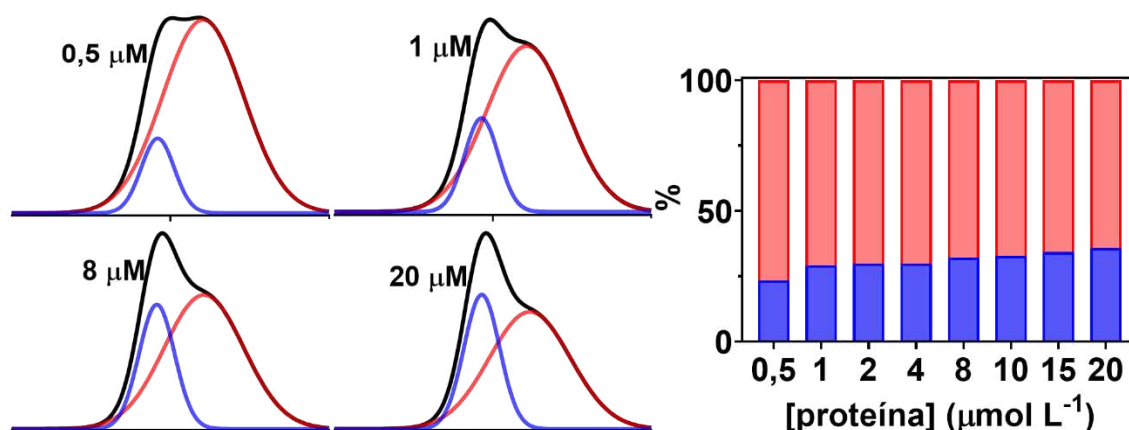
Figura 27 - Cromatogramas da HgbI nas formas met (A) e oxi (B) em diferentes concentrações ($0,5 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4.



Fonte: o autor.

Foram realizadas deconvoluções dos cromatogramas apresentados para HGbI oxi nas diferentes concentrações (Figura 28). Os picos resultantes das deconvoluções foram usados para estimar o percentual dos dois estados oligoméricos em cada concentração de proteína. Foi verificado que a população da forma oligomérica maior (dímero) aumenta com o aumento da concentração da proteína. De fato, o percentual dessa possível forma dimérica em relação a população total de proteína se alterou de 23% na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para 36%, quando a concentração foi de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 28 - Cromatogramas deconvoluídos da HGbI oxi em diferentes concentrações. Percentual das duas formas oligoméricas calculados a partir das áreas dos picos resultantes das deconvoluções: monômero (vermelho) e dímero (azul).

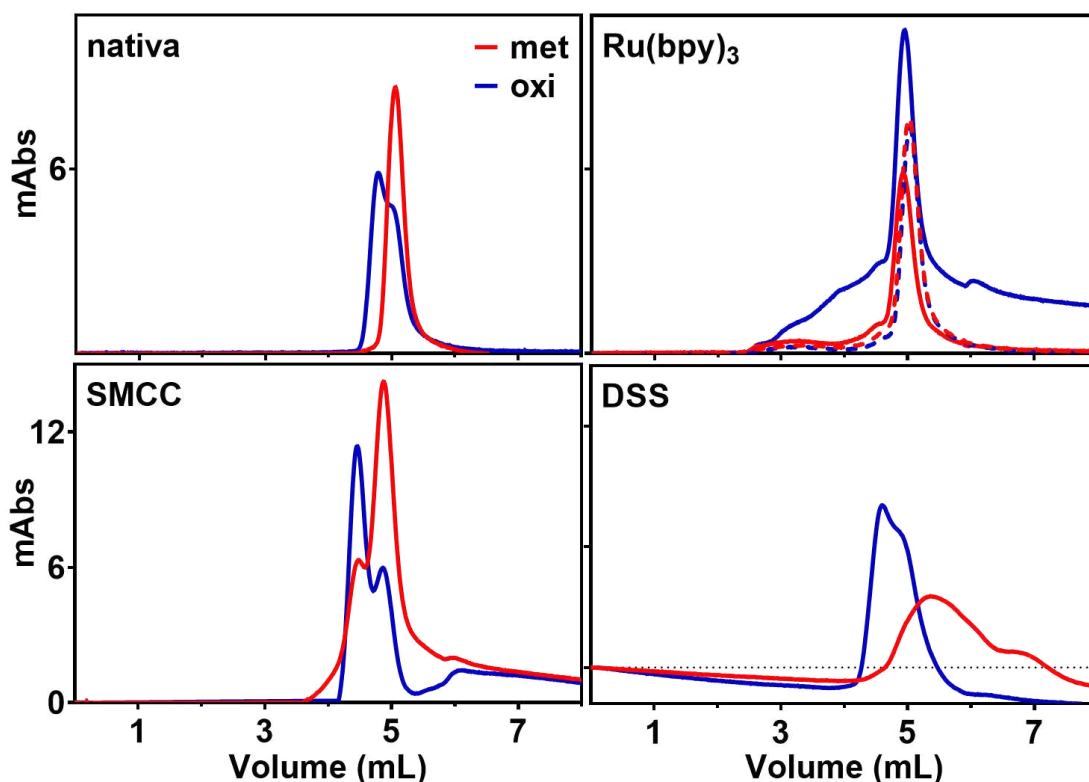


Fonte: o autor.

Com objetivo de obter informações adicionais sobre o estado oligomérico da HGbI foram realizadas tentativas de reações de *crosslink* da proteína utilizando reagentes clássicos para tal finalidade. Decorrido o período reacional, as amostras foram analisadas por meio de filtração em gel. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 29. O complexo tris(bipiridina) de rutênio II é um agente de *crosslink* fotoativado que deve promover a ligação de um resíduo de tirosina com outra tirosina vizinha ou com triptofano, cisteína ou metionina (FANCY *et al.*, ; HU; CHEN, 2015; PHANE MEUNIER; STRABLE; FINN, 2004). À primeira vista, esse reagente não parece favorecer a formação de oligômeros na HGbI, tendo em vista que após o período de incubação ambas as amostras (met e oxi), apresentaram picos com tempos de eluição iguais ao tempo assinalado para o monômero. É curioso notar que a amostra oxi, que

é a forma reduzida, apresentou um espectro de absorção que corresponde a forma met (Figura 30). O que nos indica que o complexo de rutênio promoveu a oxidação do centro metálico da proteína, com ou sem irradiação.

Figura 29 - Reações de *crosslink* com HgbI nas formas met (Fe^{3+}) e oxi ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$). Reagentes utilizados: cloreto de tris(bipiridina) de rutênio II ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$), succinimidil maleimidometil cicloexano carboxilato (SMCC) e dissuccinimidil suberato (DSS). Cromatogramas referentes a filtração em gel das amostras após reações de *crosslink*. Comprimento de onda acompanhado: 412 nm. Fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão 100 mmol L^{-1} PBS, 100 mmol L^{-1} NaCl.

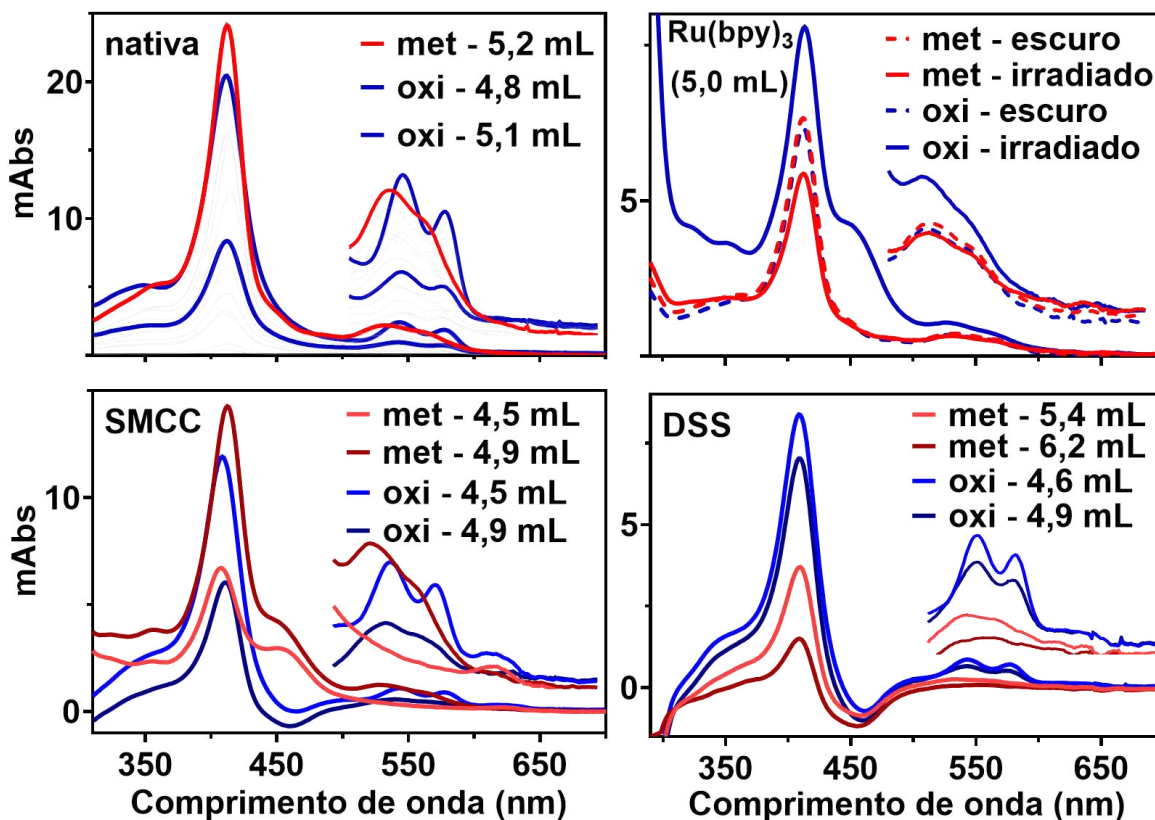


Fonte: o autor.

A incubação da proteína com o reagente SMCC apresentou um resultado bastante curioso, mesmo na forma met, a HgbI foi levada a formar oligômeros. Esse reagente é capaz de ligar-se a grupos tióis e grupos aminas promovendo o *crosslink* desses grupos entre cadeias peptídicas desde que estejam a uma distância favorável. Logo, o aumento de formas oligoméricas superiores na presença desse reagente

indica que interfaces de contato entre subunidades da proteína apresentam cadeias laterais de aminoácidos com esses grupos.

Figura 30 - Espectros de absorção eletrônica UV-Vis referentes as amostras apresentadas nos cromatogramas da figura 29.

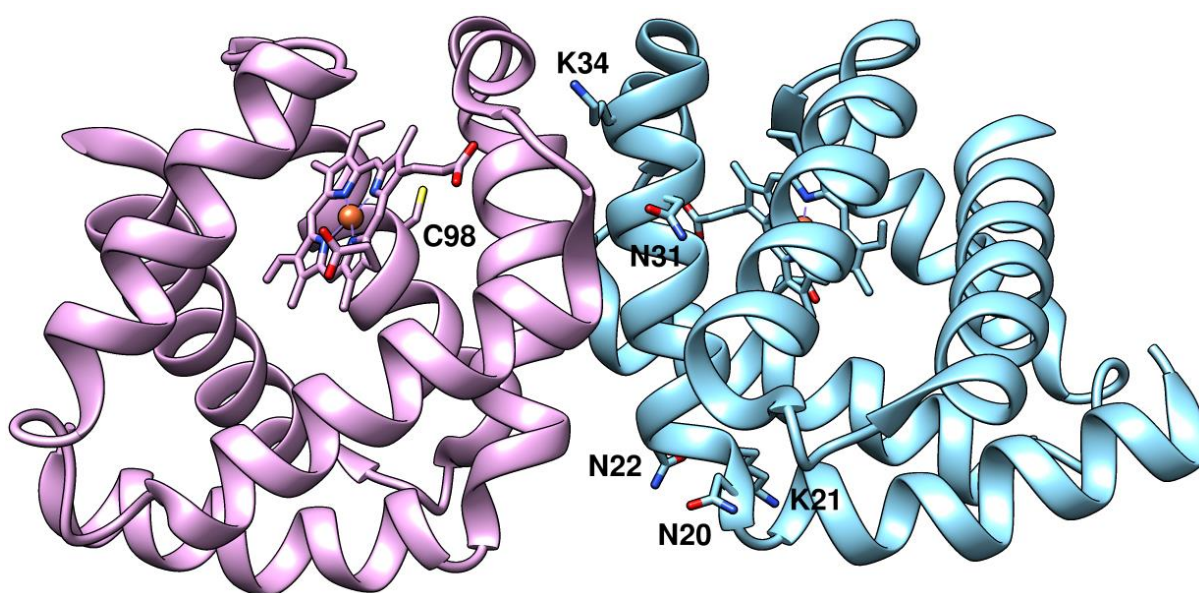


Fonte: o autor.

As estruturas cristalográficas resolvidas da HGbl (disponíveis no PDB) mostram que a proteína forma um dímero com interface hidrofóbica de contato entre as subunidades formada basicamente pelas hélices B de cada subunidade (TEH *et al.*, 2011). Nessas estruturas as cadeias laterais dos aminoácidos Asn20, Lys21, Asn22, Asn31 e Lys34 possuem grupos amina. Entretanto para ocorrer a ligação promovida pelo reagente SMCC é necessário também um grupo tiol, presente na única cisteína (Cys98) da proteína, que está localizada na hélice G. Logo, é esperado que entre as subunidades as hélices B e G da proteína estabeleçam contato na formação de oligômeros (Figura 31). Devemos também lembrar que a concentração mais elevada poderia levar que monômeros possa eventualmente reagir com outros monômeros.

Por fim, o reagente de *crosslink* DSS aparentemente não promoveu efeitos significativos na forma reduzida da HgbI ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$), dado à similaridade entre a amostra nativa e aquela tratada com este reagente. Enquanto que a proteína oxidada após tratamento com esse reagente apresentou um perfil cromatográfico irregular e com máximo em maior tempo de eluição que a forma nativa.

Figura 31 - Homodímero da HgbI com alguns aminoácidos em destaque. Subunidade 1: cisteína-98. Subunidade 2: asparquinas-20, 22 e 31 e lisinas-21 e -34.



Fonte: o autor.

4.9. Associação da HgbI ao íon cianeto (CN^-) e imidazol

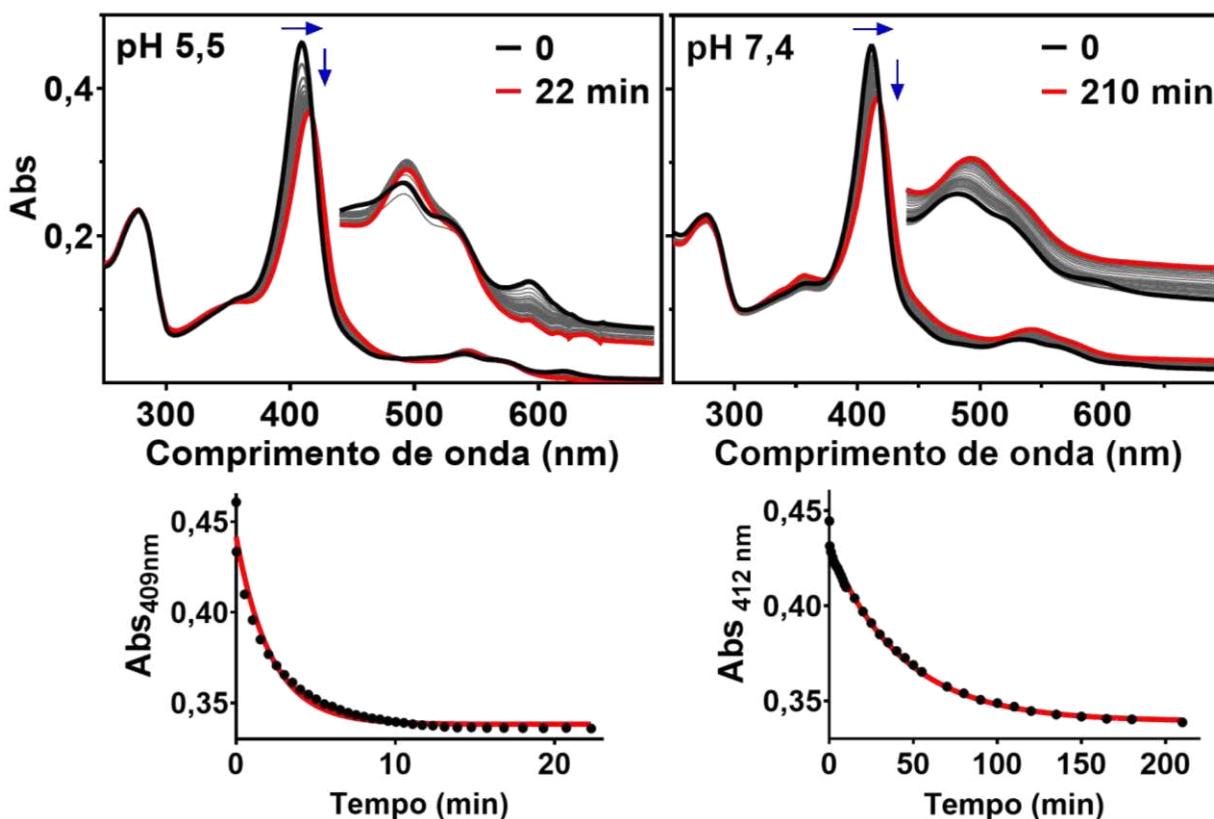
Cianeto e imidazol são ligantes típicos de hemoproteínas. No caso de CN^- a associação costuma ocorrer quando o centro metálico está na forma Fe^{3+} . A afinidade desses ligantes por essas proteínas tem sido usada como uma forma indireta de obter informações estruturais sobre a cavidade hémica.

4.9.1. Afinidade da met-HgbI por CN^-

Foram realizados ensaios cinéticos da met-HgbI com o íon CN^- . As variáveis exploradas nesses ensaios foram concentração do ligante, temperatura e pH do meio. A formação da $\text{HgbI-Fe}^{3+}\text{-CN}^-$ foi acessada pelo decaimento da absorvância no

máximo da banda Soret (409 nm e 412 nm nos pH 5,5 e 7,4; respectivamente). Na figura 32 são apresentados os espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis obtidos após incubação da HGbI-Fe³⁺ com KCN (5 mmol L⁻¹) em pH 5,5 e 7,4. Adicionalmente, são apresentadas as variações na absorbância da banda Soret em função do tempo de incubação. Como esperado, o perfil descreve a associação do ligante CN⁻ na proteína HGbI- Fe³⁺ (met).

Figura 32 - Monitoramento da reação da HGbI com o íon cianeto. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbI-Fe³⁺ (met) após incubação com KCN a 25°C. [HGbI] = 5 µmol L⁻¹; [KCN] = 5 mmol L⁻¹, em soluções 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH 5,5 e 7,4. Variação do máximo da Soret em função do tempo.



Fonte: o autor.

Em pH 5,5 o máximo da Soret surge em 415 nm, enquanto na região das bandas Q observa-se um pequeno deslocamento batocrômico da banda para 542 nm, além disso observa-se o desaparecimento da banda em 620 nm. Essa última banda normalmente é atribuída, na forma férrica de hemeprotéínas, como sendo devido a

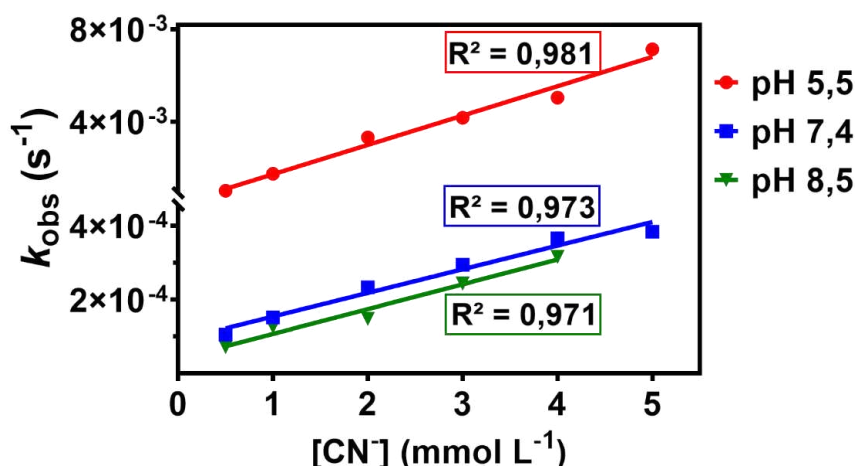
uma transferência de carga ligante-metal (LMCT). A diminuição dessa banda pode ser atribuída ao fato do CN^- substituir um ligante com menor força de desdobramento do campo cristalino na ligação com o ferro (ADAR, 1978). Em pH 7,4, a banda Soret surge em 416 nm após formação da $\text{HGbl-Fe}^{3+}\text{-CN}^-$, enquanto que na região das Q surge uma banda em 542 nm, como observado em meio ácido. Nesse pH, a banda em torno de 620 nm surge menos intensa para met-HGbl, e observa-se seu desaparecimento com a formação da met-HGbl- CN^- .

É notório que a cinética de associação do cianeto na proteína se processa mais rapidamente em meio ácido, cujos valores de k_{obs} são $7,65 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $3,90 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para pH 5,5 e pH 7,4, respectivamente. Há uma diferença de aproximadamente 20 vezes. Para a mesma concentração de cianeto o valor de k_{obs} foi de $4,04 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ em pH 8,5.

A fim de obter maiores esclarecimentos sobre essa ligação, realizou-se ensaios com concentrações variadas do ligante, sempre em excesso em relação à proteína, numa tentativa de se obter reações de pseudo-primeira ordem. Foram observadas cinéticas de associação dependentes da concentração de cianeto entre 0,5 e 5,0 mmol L^{-1} .

Na figura 33 são apresentadas as curvas que relacionam k_{obs} e a concentração do ligante. A partir dessas curvas é possível determinar as constantes cinéticas de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}), como sendo o coeficiente angular da reta e o intercepto da reta no eixo das ordenadas, respectivamente. Na tabela 5 estão os valores de k_{on} e k_{off} juntamente com valor da constante de dissociação (K_{D}), determinada indiretamente pela razão das constantes cinéticas ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$). O método mais apropriado para determinação dessa constante seria por meio de uma titulação do ligante em condição de equilíbrio, porém, a cinética de associação lenta torna essa metodologia impraticável.

Figura 33 - Curvas de k_{obs} versus concentração de cianeto. Os ensaios cinéticos foram realizados a 25°C em solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl.



Fonte: o autor.

Tabela 5 - Valores de k_{on} , k_{off} e K_D para a reação do CN⁻ com a HgbI-Fe³⁺ em diferentes pH. As cinéticas foram realizadas a 25°C em solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl.

pH	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (mM)
5,5	1,2717 (±0,0890)	4,53 · 10 ⁻⁴ (±2,70 · 10 ⁻⁴)	0,3568 (±0,2138)
7,4	0,0633 (±0,0050)	9,33 · 10 ⁻⁵ (±1,67 · 10 ⁻⁵)	1,4115 (±0,2791)
8,5	0,0667 (±0,0067)	4,00 · 10 ⁻⁵ (±1,67 · 10 ⁻⁵)	0,5959 (±0,2523)

Fonte: o autor.

Os valores de K_D indicam maior afinidade da proteína por cianeto em meio ácido (Figura). A ligação de CN⁻ a hemoproteínas pode ocorrer diretamente ou pode envolver a forma HCN. Sabendo que o pKa desse ácido é 9,2 espera-se que a ligação do CN⁻ à proteína, nos pHs 5,5 e 7,4, envolva previamente a desprotonação do ácido, a qual deve ser facilitada por um resíduo polar na porção distal do heme. Curiosamente observa-se uma cinética e também uma afinidade ao ligante significativamente diferente nesses dois pHs. Complementarmente, observam-se constantes cinéticas de mesma ordem de grandeza nos pHs 7,4 e 8,5, apesar de que

no pH mais alto a espécie desprotonada do ácido (CN^-) tornar-se consideravelmente mais presente. Isso nos leva a crer que o fator determinante nessas diferenças seja uma mudança estrutural na proteína, especificamente envolvendo as vizinhanças do grupo prostético, podendo inclusive estar relacionado a mudança do ligante interno (endógeno) ligado ao ferro na posição distal antes do CN^- entrar, o que estaria em acordo com as mudanças espectroscópicas observadas na banda Soret quando o pH do meio muda de 5,5 para 7,4.

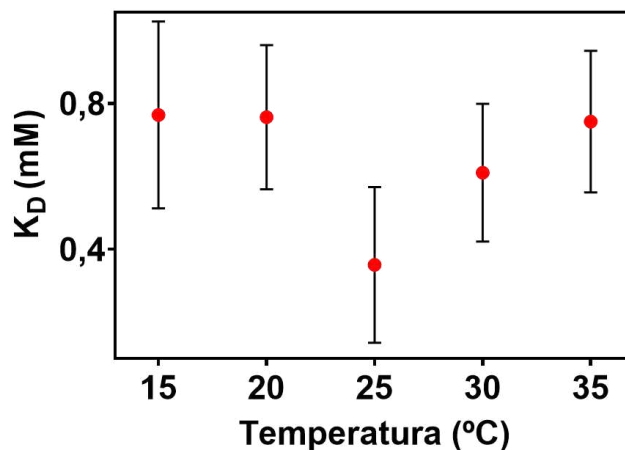
De modo geral, a cinética de associação do cianeto à met-HGbl mostrou-se bastante lenta se comparada com outras heme proteínas globinas típicas. A mioglobina nativa de baleia cachalote, por exemplo, apresenta k_{on} para essa cinética de associação de $3,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (mais de 5000 vezes superior ao valor encontrado para HGbl) (BRANCACCIO *et al.*, 1994). A substituição da histidina-64 por uma fenilalanina provocou uma drástica redução no valor de k_{on} , para $12 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (BRANCACCIO *et al.*, 1994). Essa mudança é atribuída não só ao maior impedimento histérico provocado pelo anel aromático da fenilalanina, mas também a ausência do grupo imidazólico que deve facilitar a desprotonação do HCN reduzindo seu pKa. Na HGbl, na localização relativa desse resíduo encontra-se uma glutamina.

A velocidade baixa de associação do CN^- aos monômeros da hemoglobina III e IV (*Glycera dibranchiata*) é atribuída principalmente ao ambiente pouco polar ao redor do heme. O fato dessa cinética ser mais rápida em pHs mais altos indica que preferencialmente CN^- liga-se diretamente à proteína (e não HCN). Apesar disso, a reação do HCN com a proteína parece que ocorre em menor extensão, e o fato dessa reação ser muito lenta pode ser devido à ausência de uma histidina distal que facilitaria a desprotonação do HCN (MINTOROVITCH; VAN PELT; SATTERLEE, 1989).

A HGbl apresenta elevado grau de similaridade com neuroglobinas de mamíferos (TEH *et al.*, 2011). Ao estudar a cinética de associação do CN^- a Ngb humana observou-se que essa reação é bastante lenta se comparada a outras globinas hémicas, como Mb e Hb. Além disso, os pesquisadores propuseram que essa interação ocorre com duas velocidades diferentes, e que isso se deve a conformações distintas dessa proteína (HEROLD *et al.*, 2004). Aparentemente não é o mesmo comportamento observado com HGbl, embora a taxa de associação do CN^- seja da

mesma ordem daquelas vistas para as fases rápida e lenta na hNgb (1,35 e 0,37 M⁻¹ s⁻¹, respectivamente).

Figura 34 - Valores de K_D da ligação de CN⁻ a HGbl-Fe³⁺ em diferentes temperaturas. As cinéticas foram realizadas em solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH 5,5.



Fonte: o autor.

Tabela 6 - Constantes cinéticas de associação e dissociação de CN⁻ a HGbl-Fe³⁺ em diferentes temperaturas. As cinéticas foram realizadas em solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl, pH 5,5.

T (°C)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)
15	0,4200 (±0,0343)	3,22·10 ⁻⁴ (±1,05·10 ⁻⁴)
20	0,6460 (±0,0440)	4,92·10 ⁻⁴ (±1,23·10 ⁻⁴)
25	1,2717 (±0,0890)	4,53·10 ⁻⁴ (±2,70·10 ⁻⁴)
30	1,7300 (±0,1050)	1,06·10 ⁻³ (±3,20·10 ⁻⁴)
35	2,6817 (±0,1667)	2,01·10 ⁻³ (±5,07·10 ⁻⁴)

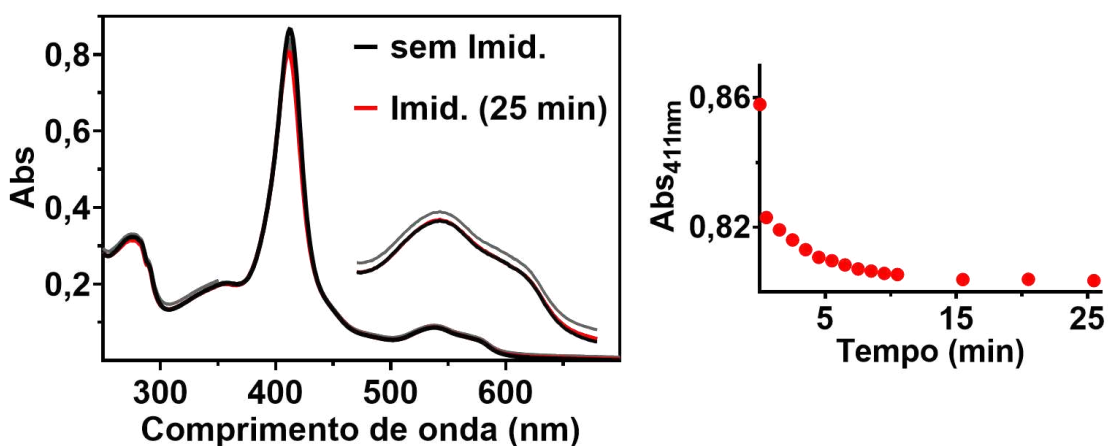
Fonte: o autor.

Com o objetivo de obter dados termodinâmicos relacionados a ligação do cianeto com a HGbI, foram realizadas medidas em diferentes temperaturas em pH 5,5. Embora se tenha observado um aumento na velocidade de associação com a temperatura (aumento de k_{on}) (Tabela 6), os valores de K_D não variaram linearmente com a temperatura (Figura 34) como observado em muito sistemas. Adicionalmente, são observados desvio padrão elevado nos valores de K_D , de modo que não é possível atribuir nenhuma mudança significativa na afinidade do ligante pela proteína em função da temperatura.

4.9.2. Interação do imidazol com met-HGbI

Foi realizado um acompanhamento cinético da associação do imidazol a met-HGbI (Fe^{3+}) por meio de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis. Os espectros eletrônicos obtidos antes e após adição de imidazol à proteína são apresentados na figura 35, juntamente com a variação da absorbância da banda Soret.

Figura 35 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis da met-HGbI (Fe^{3+}) antes e durante reação com imidazol. $[HGbI] = 8 \mu mol L^{-1}$, $[imidazol] = 2 mmol L^{-1}$. Tampão $100 mmol L^{-1}$ fosfato, $100 mmol L^{-1}$ NaCl, pH 7,4 ($25 ^\circ C$). *Inset*: variação da absorbância da banda Soret em função do tempo de reação com imidazol.

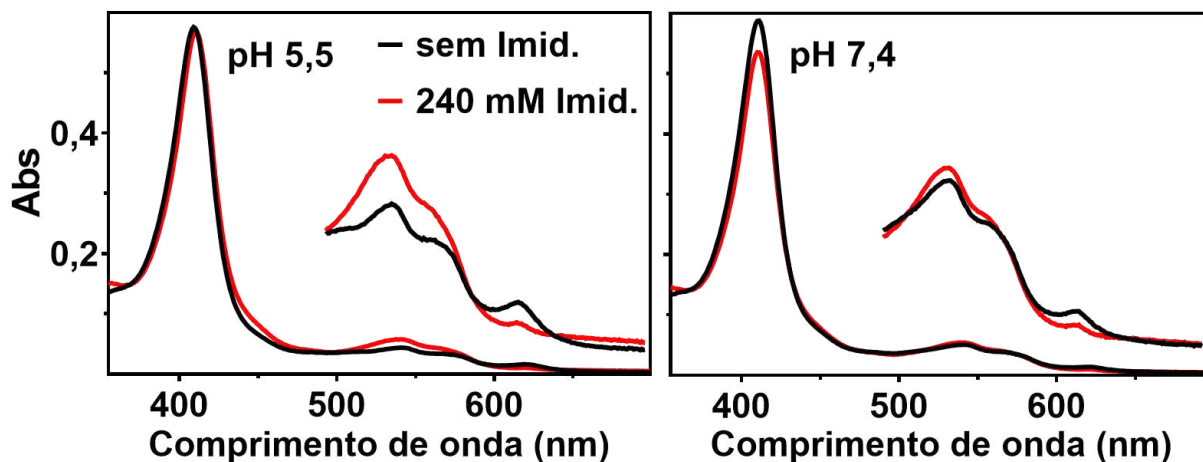


Fonte: o autor.

Aparentemente, a HGbI na forma met se liga ao imidazol em pH 7,4, visto que são observadas mudanças, ainda que discretas, na banda Soret quando esse composto é adicionado à proteína. A rápida mudança no espectro logo após a adição do imidazol sugeriu uma cinética de associação mais rápida do que foi observado para o íon cianeto nas mesmas condições. Todavia, as mudanças espectrais observadas em decorrência da adição de imidazol são bastante sutis, o comprimento de onda máximo da Soret passou de 412 para 411 nm, enquanto que a absorvância variou apenas 7%. Essas semelhanças espectroscópicas são sugestivas de que a ligação ao imidazol modifica pouco o microambiente circundante do heme. A ligação desta molécula deve estar acompanhada do desligamento do resíduo interno (endógeno) ao heme, cujas propriedades eletrônicas devem ser parecidas com as do imidazol, como seria o caso da histidina, que apresenta um anel imidazólico como cadeia lateral. Existem duas histidinas na estrutura da HGbI, sendo que uma se encontra ligada ao centro metálico no sítio proximal (His82), enquanto a outra (His91), de acordo com a estrutura cristalográfica, encontra-se lateralmente ao heme, numa posição pouco favorável para que ocorra a sua coordenação com Fe^{3+} . É importante salientar que as condições de cristalização na maioria das vezes são bastante diferentes das condições fisiológicas ou daquelas usadas nos ensaios em solução. De modo que é possível que ocorram arranjos estruturais diferentes entre a proteína cristalizada e aquela investigada numa solução em condições mais brandas. Além de histidinas, outros resíduos que se coordenam ao grupo heme de proteínas são cisteínas, tirosinas, metioninas e lisinas (WISSBROCK *et al.*, 2019). A lisina-53 (K53), de acordo com estrutura cristalográfica da met-HGbI-act (PDB:3S1J), seria um forte candidato a coordenar-se ao ferro através de seu N da cadeia lateral.

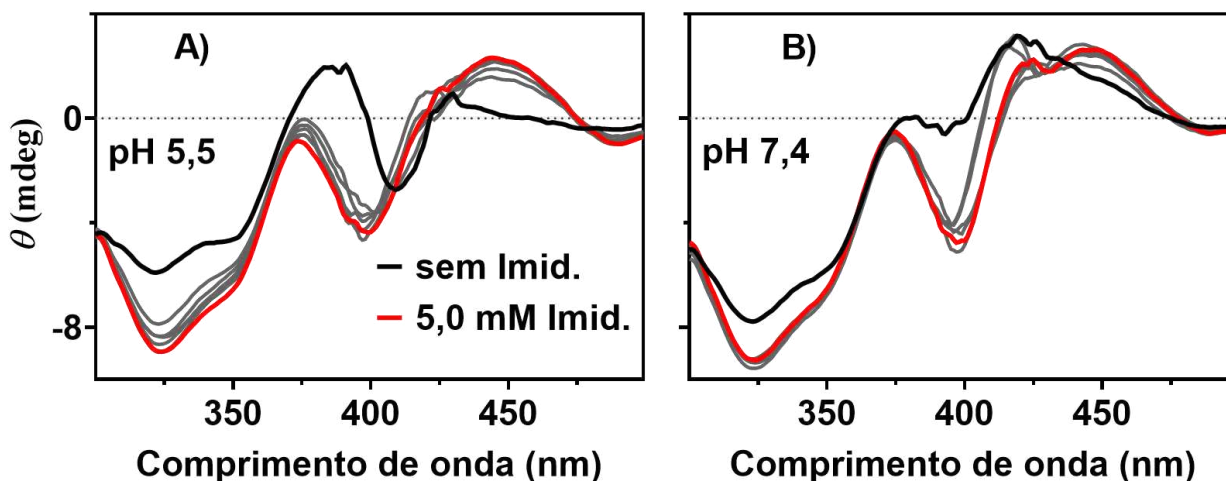
Como discutido anteriormente, as mudanças espectroscópicas da met-HGbI quando colocada em condições mais ácidas são sugestivas de que a coordenação do íon ferro é dependente do pH do meio. Na figura 36 são apresentados os espectros da met-HGbI em pH 5,5 e 7,4 antes e após incubação com grande excesso de imidazol (240 mM). A proteína aparentemente se liga ao imidazol mesmo em meio ácido. Os espectros de dicroísmo circular (Figura 37) corroboram a ligação de imidazol com a HGbI met em ambos os pHs.

Figura 36 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis da HGbI-Fe³⁺ (met) em pH 5,5 e 7,4, antes e após reação com imidazol. [HGbI] = 5 μmol L⁻¹, [imidazol] = 240 mmol L⁻¹. Solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl (25 °C).



Fonte: o autor.

Figura 37 - Espectros de dicroísmo circular da HGbI-Fe³⁺ (met) antes e após encubação com imidazol. [HGbI] = 20 μmol L⁻¹, [imidazol] = 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L⁻¹. Solução 100 mmol L⁻¹ fosfato, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 25 °C. A) Espectros de CD na região da banda Soret, pH 5,5. B) Espectros de CD na região da banda Soret, pH 7,4. C) Espectros de CD na região do ultravioleta próximo, pH 5,5. D) Espectros de CD na região do ultravioleta próximo, pH 7,4.



Fonte: o autor.

4.10. Investigação de processos biocatalíticos

Apesar das investigações a respeito da proteína *Hell's Gate globin I* terem sido iniciadas a mais de uma década, sabe-se ainda muito pouco a respeito de suas funções no microorganismo *M. inferorum*. No trabalho publicado em 2011, especulou-se algumas possibilidades, tais como, transportadora de O₂, sensor molecular de gases através de ligação reversível ao grupo heme e funções relacionadas a química redox do heme; no entanto nenhuma delas pode ser confirmada ou descartada de forma definitiva (TEH *et al.*, 2011). Em um estudo recente, em que se investigou o perfil eletroquímico da proteína, foi encontrado um potencial de redução muito baixo para o centro metálico, com isso ganhou força a impossibilidade de que essa proteína atuasse no transporte ou armazenamento de O₂, assim como sensora de O₂. Por outro lado, esses resultados abrem caminho para a possibilidade de que a HGbl funcione como catalisadora em processos envolvendo o par redox Fe²⁺/Fe³⁺ do grupo heme (SOUZA *et al.*, 2022).

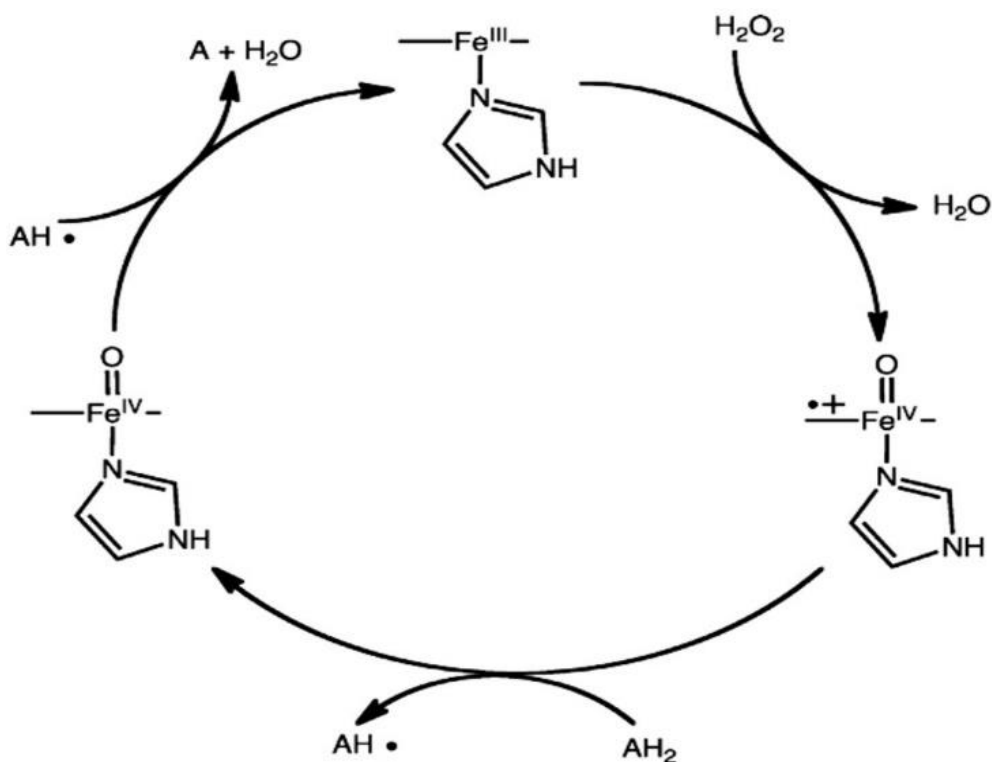
Recentemente, muitos esforços têm sido realizados com objetivo de identificar proteínas com atividades catalíticas naturais ou não naturais, e que possam ser inclusive melhoradas genética ou quimicamente. Dentre esses sistemas, proteínas oriundas de microorganismos extremófilos são de interesse particular (BORDEAUX; SINGH; FASAN, 2014; CAI *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2012; GOBER; BRUSTAD, 2016; LI *et al.*, 2017; NATOLI; HARTWIG, 2018; REETZ, 2019; SCHWIZER *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2018; WARD, 2016; WATANABE; UENO, 2003; WEI; ANG; ZHAO, 2018; WIESZCZYCKA; STASZAK, 2017; WOLF; VARGAS; LEHNERT, 2017; YIN *et al.*, 2018b). Tendo isso em mente, alguns ensaios preliminares foram realizados com objetivo de identificar uma possível ação biocatalítica da HGbl. Na verdade, recentemente, identificou-se que a HGbl tem potencial como biocatalisador para a reação não natural de ciclopropanação (KIM *et al.*, 2019), todavia, diversas outras atividades ainda merecem ser investigadas, inclusive em condições mais extremas de temperatura e pH.

4.10.1 Atividade Peroxidase

A atividade peroxidase diz respeito a acelerar a quebra da molécula de peróxido de hidrogênio, a qual pode, em muitos casos, participar da oxidação de um substrato. O mecanismo mais aceito para esse tipo de reação em hemeproteínas

envolve a formação de um complexo ferril [Fe(IV)=O] e um radical porfirínico a partir da reação do heme da peroxidase com o H₂O₂. O substrato é convertido a radical e em seguida oxidado pelo complexo ferril, que volta a ser heme-Fe(III) (LONG *et al.*, 2016).

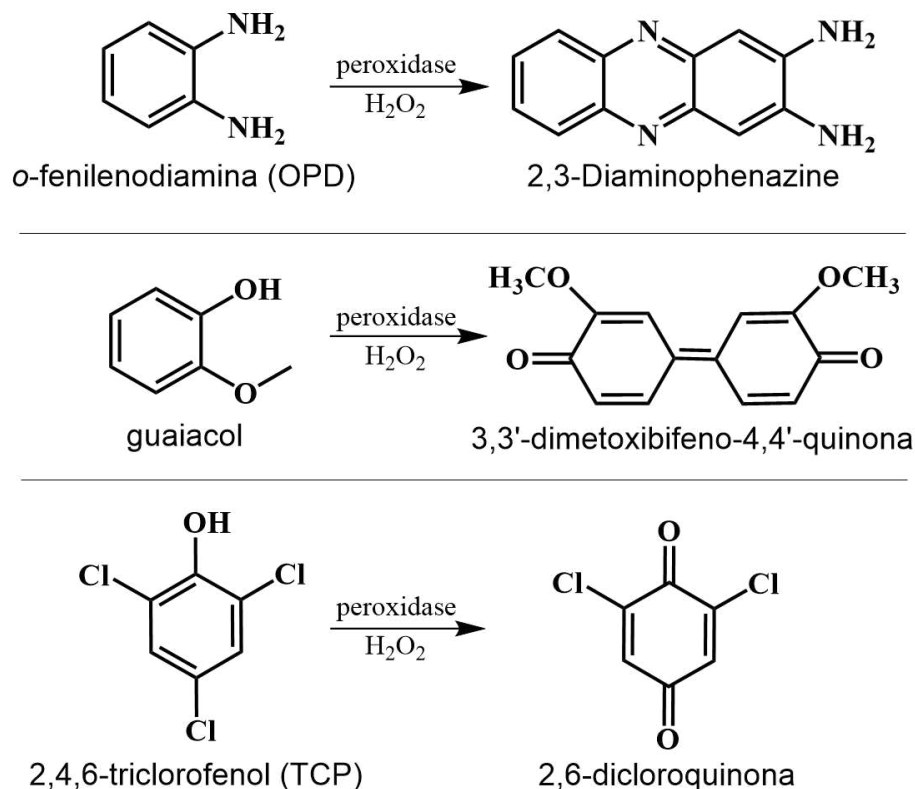
Figura 38 - Representação do mecanismo de oxidação de um substrato por uma enzima peroxidase.



Fonte: adaptado de Long *et al* (2015).

A HGBI teve sua atividade peroxidase preliminarmente avaliada com o emprego de três substratos comumente usados nesse tipo de ensaio, embora existam vários outros substratos possíveis para essa catálise. Devido suas semelhanças estruturais com a mioglobina, que também vem sendo explorada nesse tipo de catálise (BORDEAUX; SINGH; FASAN, 2014; OOHORA *et al.*, 2013; OZAKI; MATSUI; WATANABE, 1997; OZAKI; YANG; MATSUI, 1999; SREENILAYAM; FASAN, 2014; TINOCO *et al.*, 2017; TYAGI *et al.*, 2016; VARGAS *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2003; YIN *et al.*, 2018b), esperava-se que a proteína extremófila apresentasse alguma atividade dessa natureza.

Tabela 7 - Substratos e produtos nos ensaios de peroxidase.



Fonte: elaborada pelo autor.

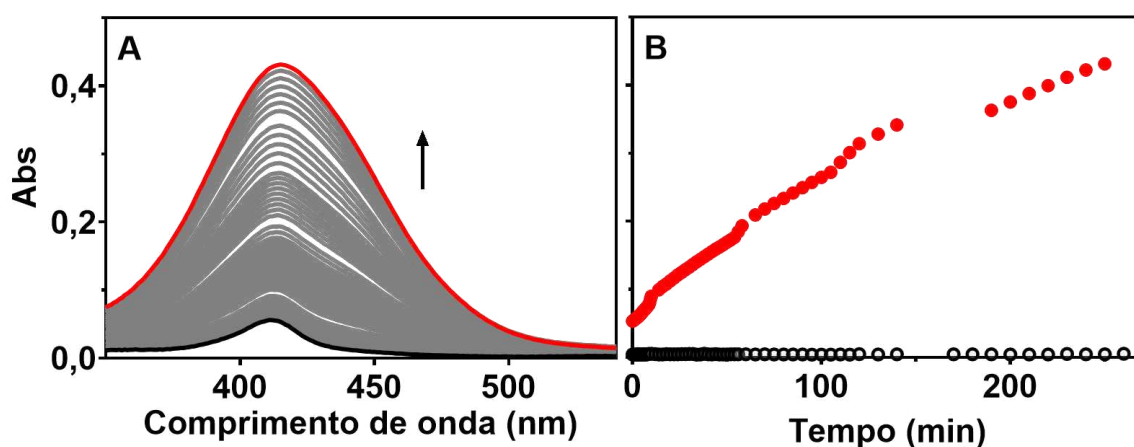
4.10.1.1. Atividade Peroxidase com o Substrato o-Fenilenodiamina (OPD)

O reagente o-fenilenodiamina (OPD) é incolor e não fluorescente, e rotineiramente é usado para quantificar a atividade peroxidase devido a formação de produtos com bandas de absorção na região do visível (FORNERA; WALDE, 2010a). Assim, foi realizado o ensaio de peroxidase da HGBI mediante incubação da proteína com o reagente OPD (substrato) e peróxido de hidrogênio em tampão 50 mmol L⁻¹ PBS, 150 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,2, a 25°C. A mistura reacional foi monitorada durante cerca de 4 horas por espectroscopia eletrônica. Na Figura 39 são apresentados os espectros de absorção eletrônica obtidos durante esse monitoramento cinético.

Nesse experimento é possível observar o aumento da banda, com máximo em 415 nm, com o tempo. Esse comportamento se deve a formação do produto 2,3-diaminofenazina, um dos produtos mais comuns da ação de peroxidase sob o OPD (FORNERA; WALDE, 2010a). Adicionalmente, foram realizados experimentos

controles sem a proteína, não sendo observado esse comportamento, sustentando, preliminarmente, que a HGbI apresenta atividade peroxidase nessas condições de pH e temperatura.

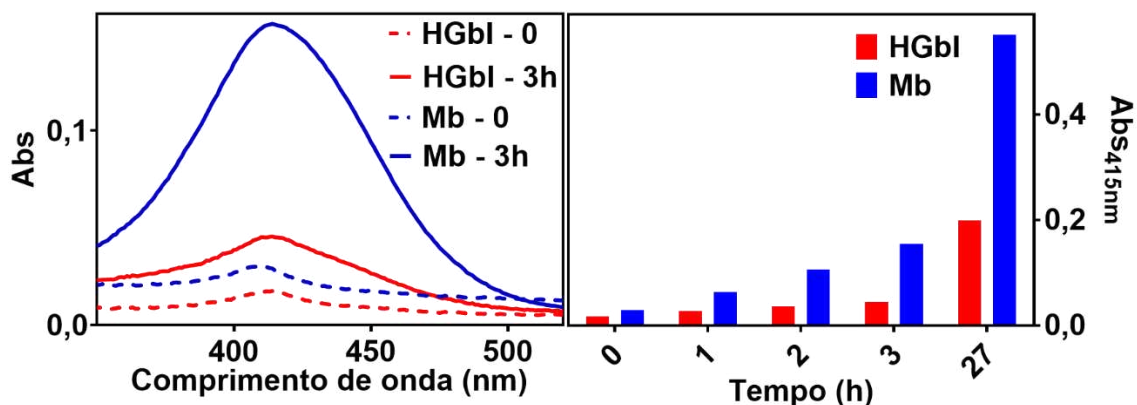
Figura 39 - Atividade peroxidase da HGbI empregando OPD como substrato. A) espectros eletrônicos coletados ao longo do tempo; B) monitoramento da variação da absorbância em 415 nm no tempo (círculos vermelhos cheios). Círculos pretos abertos são referentes ao controle feito sem a proteína. Concentrações usadas: 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HGbI; 3,5 mmol L^{-1} de OPD e 3,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,2; a 25°C.



Fonte: o autor.

A fim de ter um referencial quanto a essa atividade catalítica, foi realizado um ensaio similar com a mioglobina lado a lado com a HGbI, nas mesmas condições de pH e temperatura. Embora a mioglobina não se configure como uma peroxidase típica, esta apresenta certa atividade enzimática nesse tipo de reação e no caso de certos mutantes da proteína ou com cofatores diferentes do heme verificou-se eficiência catalítica melhorada (GUO *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2016). Na Figura 40 são apresentados espectros eletrônicos representativos obtidos durante monitoramento da reação entre OPD e H_2O_2 , catalisada por essas proteínas. Importante mencionar que a mioglobina apresentou atividade significativamente superior ao da HGbI, em todos os intervalos de tempo investigados.

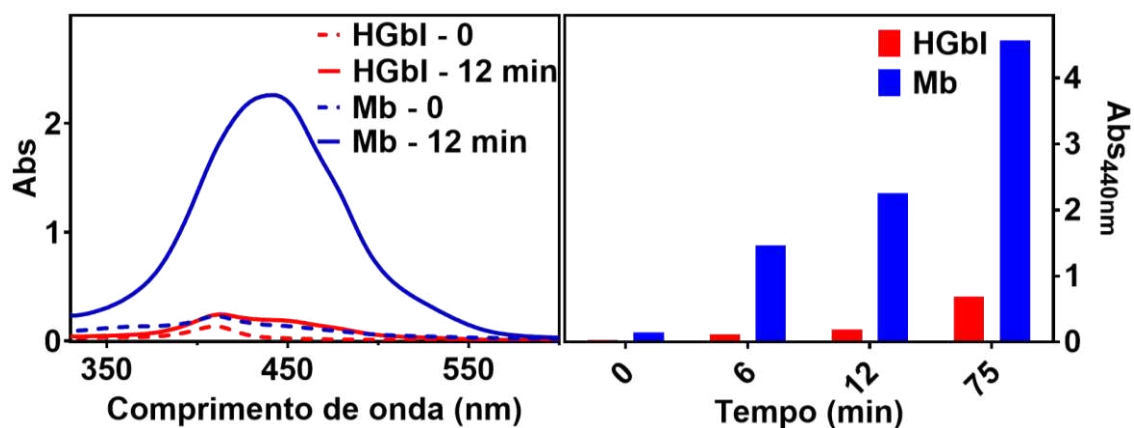
Figura 40 - Atividade peroxidase da Mb e da HGbl empregando OPD como substrato. Concentrações: 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 3,14 mmol L^{-1} de OPD e 0,04 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,2; a 25°C.



Fonte: o autor.

Tendo em vista que o microrganismo *M. inferorum* trata-se de um acidófilo, é possível que a proteína funcione melhor em pH mais baixo. Desse modo, realizou-se o ensaio de peroxidase em tampão 50 mmol L^{-1} citrato, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 5,0, a 25°C. Entretanto, novamente, a atividade peroxidase da HGbl foi inferior ao da mioglobina. O resultado é apresentado na Figura 41.

Figura 41 - Atividade peroxidase da Mb e da HGbl empregando OPD como substrato. Concentrações: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 3,14 mmol L^{-1} de OPD e 2,7 mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} citrato, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 5,0; a 25°C.



Fonte: o autor.

As atividades catalíticas de enzimas são influenciadas enormemente por interações eletrostáticas, orientação do substrato e topografia do sítio ativo. No caso

das peroxidases outro fator tem uma influência considerável: o potencial redox do grupo heme. Peroxidases costumam apresentar par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ com potenciais mais negativos (AYALA, 2010). Isso sugere que o centro metálico adquire estados de oxidação mais elevados que podem ser suficientemente estabilizados na reação. Durante o processo catalítico de uma peroxidase, os Compostos I e II são formados, os quais apresentam o ferro com estado de oxidação IV. O par redox Composto II/ Fe^{3+} envolvido no ciclo catalítico das peroxidases apresenta seu próprio potencial de redução. Quanto maior for o potencial de redução desse par maior será a capacidade oxidante da peroxidase. Apesar da dificuldade prática em se medir esse potencial e das metodologia variadas empregadas nos trabalhos, há aparentemente uma tendência de que quanto mais positivo for o potencial de redução do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, maior será o potencial de redução do Composto II e, conseqüentemente, mais oxidante será a enzima peroxidase (AYALA, 2010). Recentemente, o potencial do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ da HGBI foi determinado como sendo de -305 mV (vs ENH). Esse valor assemelha-se ao encontrado para peroxidase de *Glycine max* (-310 mV), a qual apresenta potencial de redução do par redox Composto II/ Fe^{3+} igual a $+950$ mV. Assumindo que a HGBI apresente um valor similar para esse par redox, espera-se que, do ponto de vista termodinâmico, seja capaz de oxidar o-fenilenodiamina ($E = +400$ mV) (JENKINS *et al.*, 2021).

De fato, a reação catalítica de oxidação do OPD ocorreu na presença de HGBI, contudo a proteína apresentou uma eficiência muito inferior se comparada com peroxidases clássicas. A explicação para isso pode estar associada ao sítio catalítico da proteína e seu acesso por parte dos substratos. A superfamília das heme peroxidases possui em comum o ferro-protoporfirina IX não ligado covalentemente a cadeia polipeptídica, assim como observado para HGBI. Além disso, essas enzimas possuem sempre um canal que conecta a cavidade hémica ao solvente, pelo qual moléculas de H_2O_2 e pequenos substratos a serem oxidados têm acesso ao centro catalítico. Algumas peroxidases possuem dois desses canais de acesso (AYALA, 2010). A estrutura de raios-X resolvida da HGBI revela que existem vários túneis na estrutura da proteína que podem promover o acesso de um ligante ao grupo heme (TEH *et al.*, 2011). Dito isto, a baixa compatibilidade do OPD como substrato da HGBI poderia residir no impedimento estérico do sítio de ligação em si. Estima-se, a partir dos dados cristalográficos, que o volume da cavidade hémica é em torno de 100 \AA^3

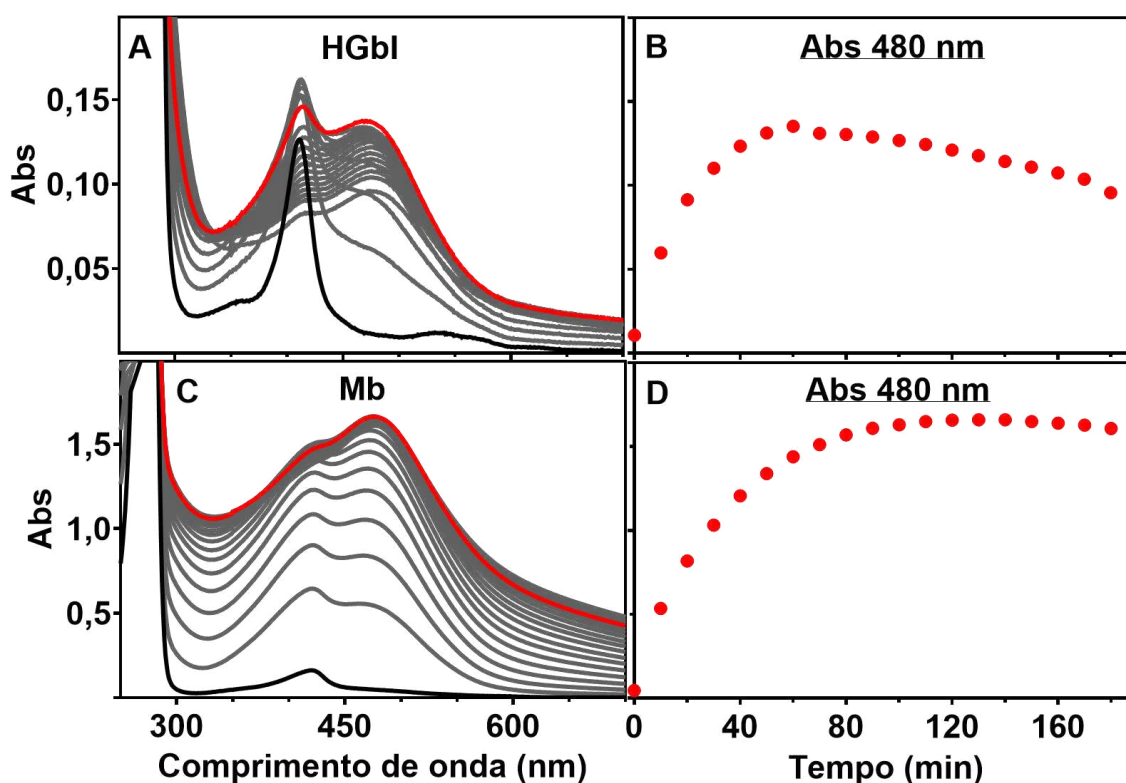
(TEH *et al.*, 2011), enquanto que o OPD tem em média 170 \AA^3 . Considerando certo grau de elasticidade da estrutura de uma proteína e, portanto, admitindo que uma molécula volumosa possa ainda assim ter acesso ao grupo heme da HGbI, outros aspectos estruturais podem ser levados em consideração na catálise, como a presença de resíduos de aminoácidos que participam da reação. Esses aspectos serão discutidos na seção seguinte, após apresentação dos resultados para reação catalítica de peroxidase com outro substrato.

4.10.1.2. Atividade Peroxidase com o Substrato Guaiacol

O guaiacol é um dos substratos mais comuns no estudo de atividade peroxidase (WATANABE; UENO, 2003). A oxidação dessa molécula por abstração de um único elétron origina um produto final colorido, com forte absorção em aproximadamente 480 nm (Tabela 5). Dessa forma, foi realizado o ensaio de peroxidase empregando o guaiacol como substrato, mediante incubação com HGbI, e tendo início a reação pela adição de H_2O_2 , em tampão pH 7,0 e a 25°C . As condições de temperatura, pH e concentrações de substratos e proteína foram as mesmas utilizadas por Ozaki (OZAKI *et al.*, 2001b). O mesmo ensaio foi realizado com a mioglobina (Mb), com objetivo de comparação da atividade biocatalítica. Na Figura 42 são apresentados os espectros de absorção eletrônica obtidos em intervalos de tempo regulares, durante a incubação das proteínas com o substrato orgânico e H_2O_2 . Adicionalmente, são apresentados os perfis de variação da absorbância em 480 nm em função do tempo. Ensaio controle foram realizados (anexo). Na ausência de proteína não se verificou oxidação do guaiacol.

Os espectros apresentados na Figura 42, assim como a variação da absorbância máxima em função do tempo, nos permitem concluir que a HGbI apresenta atividade peroxidase frente ao substrato guaiacol. Contudo, esta atividade ainda é drasticamente inferior àquela observada para a mioglobina nativa. Esses resultados possibilitam ainda afirmarmos que a oxidação do substrato pela HGbI é cerca de 12 vezes inferior ao observado com Mb.

Figura 42 - Atividade peroxidase da HGbl e da Mb empregando guaiacol como substrato orgânico. Concentrações empregadas: $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 2mmol L^{-1} de Guaiacol e 2mmol L^{-1} de H_2O_2 , em tampão 50mmol L^{-1} PBS / 150mmol L^{-1} NaCl pH 7,0; a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A) Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para a reação do guaiacol e H_2O_2 na presença de HGbl; B) Variação da absorbância em 480 nm observada em (A) em função do tempo. C) Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para a reação do guaiacol e H_2O_2 na presença da Mb; D) Variação da absorbância em 480 nm observada em (C) em função do tempo.

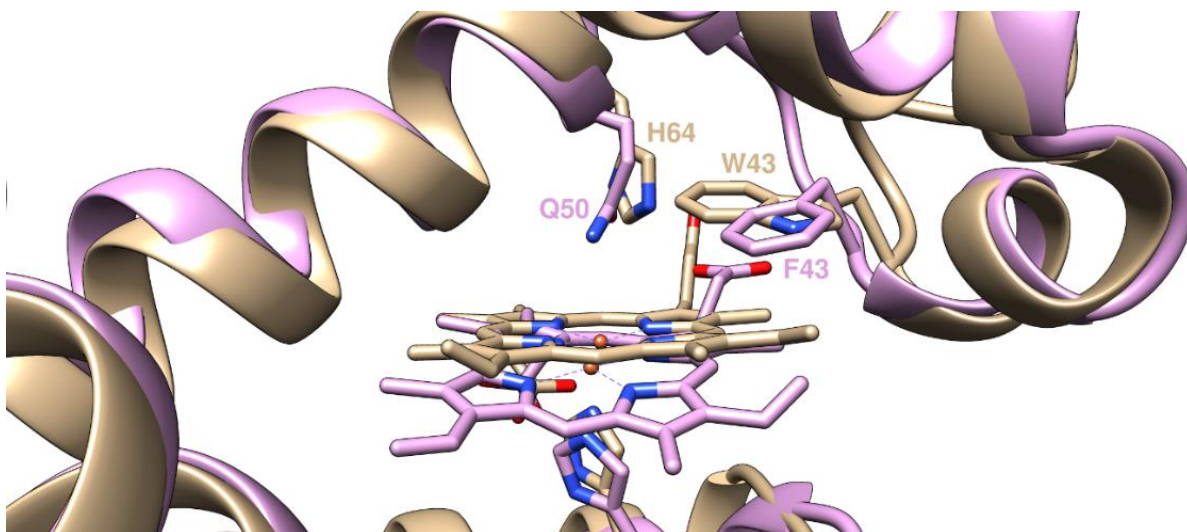


Fonte: o autor.

Ozaki e colaboradores, utilizando mutantes da mioglobina na oxidação do guaiacol, observaram que o mutante preparado com a substituição da fenilalanina 43 (F43) por um triptofano (mutante F43W) apresentou uma atividade peroxidase 3-4 vezes maior que a proteína nativa. Curiosamente, quando preparado um duplo mutante com substituição da fenilalanina 43 e histidina 64 por triptofano e leucina, respectivamente (F43W/H64L), a atividade peroxidase foi inferior ao do primeiro mutante (F43W) (OZAKI *et al.*, 2001a). Os investigadores atribuíram isso ao fato de o W43

acelerar a reação do grupo heme com o H_2O_2 , dado que a formação do composto I (radical porfirínico $Fe(IV)=O$) deve ser a etapa determinante do processo. E, adicionalmente, a redução da atividade quanto se prepara o duplo mutante se deve à ausência da histidina no bolso distal do heme, dado suas propriedades catalisadoras ácido-base, que devem ser relevantes.

Figura 43 - Representação dos sítios hêmicos sobrepostos da HGBI (lilás) e da mioglobina mutante F43W (amarelo) com alguns aminoácidos em destaque. As estruturas foram construídas através dos dados disponíveis no Protein Data Bank (PDB_3S1J e PDB_1VXA). O software Chimera foi utilizado para sobreposição.



Fonte: o autor.

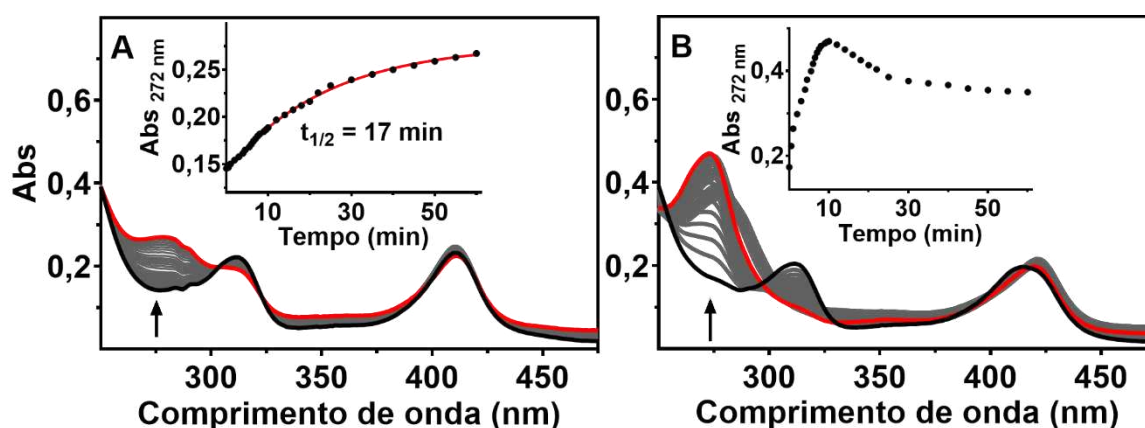
A baixa atividade peroxidase da HGBI frente ao guaiacol talvez seja explicada pela ausência de uma histidina próxima ao sítio catalítico da proteína. Apesar de haver uma fenilalanina nas proximidades do heme (Figura 43), o que poderia facilitar a ativação do peróxido, aparentemente, a reação necessita da ação conjunta dos dois aminoácidos. Esses indícios abrem perspectivas para que sejam preparados mutantes desta proteína a fim de possivelmente melhorar sua atividade.

4.10.1.3. Atividade Peroxidase com o Substrato 2,4,6-triclorofenol (TCP)

Halofenóis são usados como pesticidas, e são muito nocivos ao fígado e sistema imunológico de mamíferos, além disso, podem ser convertidos a espécies radiculares que apresentam potencial carcinogênico(YIN *et al.*, 2018b). Há um interesse crescente no desenvolvimento de catalisadores, em especial biocatalisadores, que possam converter halofenóis em produtos menos tóxicos(LIAO *et al.*, 2016).

Tendo isso em mente, a HGbl teve sua atividade dealoperoxidase testada na conversão do 2,4,6-triclorofenol (TCP) em 2,6-dicloroquinona (Tabela 7). Na Figura 44 estão apresentados os espectros de absorção eletrônica decorrentes dessa reação com o tempo, quando se incubou as proteínas (HGbl e Mb) com TCP e H₂O₂. Adicionalmente, incluiu-se os gráficos do monitoramento cinéticos da variação da absorbância em 272 nm em função do tempo.

Figura 44 - Atividade dealoperoxidase da HGbl (A) e da Mb (B) empregando 2,4,6-triclorofenol (TCP) como substrato. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis. Concentrações: 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; 0,1 mmol L^{-1} de TCP e 0,5 mmol L^{-1} de H₂O₂, em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,0 e a 25°C.



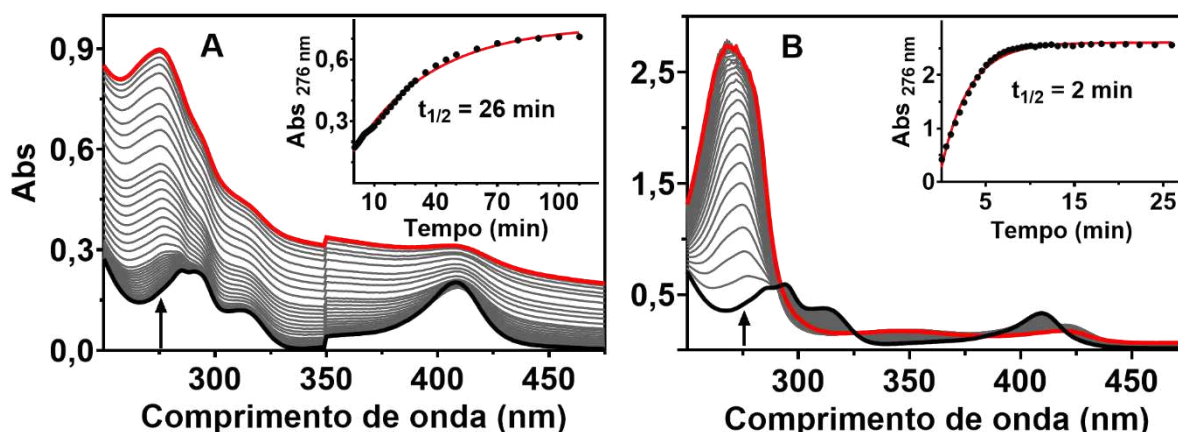
Fonte: o autor.

Nessa reação de peroxidase, novamente, a mioglobina apresentou uma eficiência catalítica superior a HGbl, embora nesse caso a razão entre as concentrações de substrato oxidado não seja tão diferente entre elas (1,30). Na reação catalisada pela Mb, em apenas 10 min a absorbância em 272 nm atinge o valor máximo. No caso da HGbl, mesmo após 50 min de reação, a banda do produto continua aumentando.

Levando-se em consideração que a HGbI é oriunda de um organismo acidófilo, surge a hipótese de que suas funções sejam otimizadas em condições de baixos pH. Dessa forma, realizou-se o ensaio de dealperoxidase em meio ácido. Como feito anteriormente, a mioglobina foi utilizada como padrão de comparação.

Os resultados, apresentados na Figura 45, indicam que a atividade dealperoxidase da HGbI é significativamente melhorada em meio ácido. Embora a reação se torne, aparentemente, mais lenta em pH 5,5, o número de moléculas de substrato convertidas a produto é cerca de 2,6 vezes maior em baixo pH, considerando que a absorvidade molar do produto formado seja a mesma em ambos os pHs. Contudo, o aumento na eficiência da mioglobina na catálise da reação em questão em pH baixo é ainda superior aquele observado para HGbI.

Figura 45 - Atividade dealperoxidase da HGbI (A) e da Mb (B) empregando 2,4,6-triclorofenol (TCP) como substrato. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis. Concentrações: $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de TCP e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 , em tampão 50 mmol L^{-1} PBS, 150 mmol L^{-1} NaCl pH 5,5 e a 25°C .

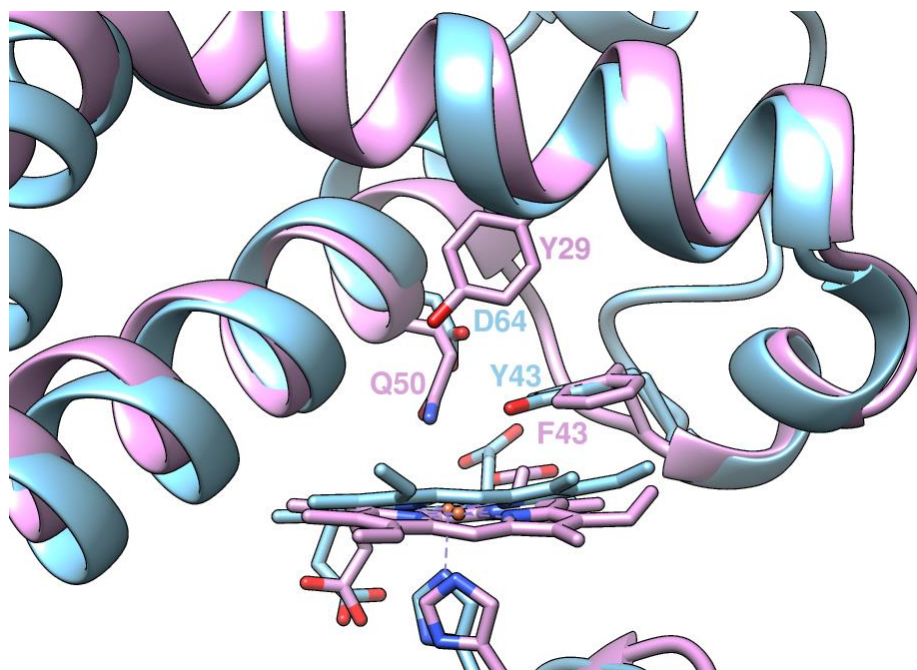


Fonte: o autor.

Uma característica comum a dealperoxidases naturais é a presença de uma tirosina (Y) no sítio distal do grupo heme onde ocorre a reação com o substrato, enquanto que declorperoxidases (uma subclasse das dealperoxidases) possuem também um aspartato (D) próximo ao sítio de ligação do substrato. O grupo hidroxil da tirosina forma uma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxil do substrato,

enquanto que o aspartato interage com outros aminoácidos e com moléculas de água, garantindo uma configuração ideal do sítio catalítico (YIN *et al.*, 2018b). Lin e colaboradores, através de mutagênese de sítio dirigida, prepararam um mutante da mioglobina substituindo a fenilalanina 43 por uma tirosina, e assim conseguiram observar uma atividade dealoperoxidase (DHP) 150 vezes mais eficiente do que com a própria enzima DHP nativa (LIAO *et al.*, 2016). Posteriormente, o mesmo grupo preparou um duplo mutante F43Y/H64D, e observou uma eficiência catalítica que superou em mais 1000 vezes aquela da DHP nativa (YIN *et al.*, 2018b).

Figura 46 - Representação dos sítios hémicos sobrepostos da HGBI (lilás) e da mioglobina mutante F43Y/H64D (azul) com alguns aminoácidos em destaque. As estruturas foram construídas através dos dados disponíveis no Protein Data Bank (PDB_3S1J e PDB_1VXA). O software Chimera foi utilizado para sobreposição.



Fonte: o autor.

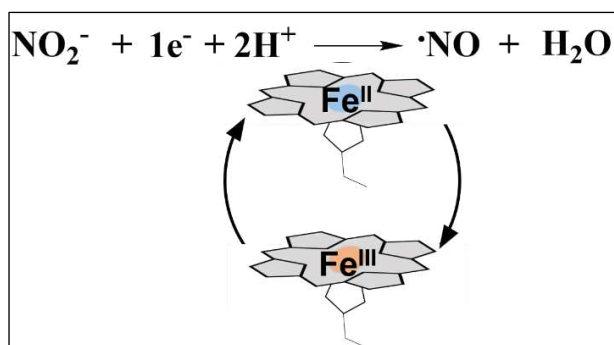
A HGBI apresenta uma tirosina (Y29) nas proximidades do plano distal do grupo heme (Figura 46). Contudo, a distância desse resíduo em relação ao heme pode ser desfavorável para que haja interação com o substrato enquanto este é oxidado. Além disso, a baixa atividade catalítica da HGBI quanto a essa reação pode ser atribuída à ausência de um aspartato no sítio do heme ou de outros resíduos que

possam estabelecer ligações com moléculas de água e garantir uma configuração ideal para acomodação do substrato, assim como proposto para o mutante Mb F43Y/H64D. Ensaios com outros substratos, contendo halogênios diferentes do cloro podem ajudar também a melhor esclarecer essa questão.

4.10.2. Atividade Nitrito Redutase

Durante anos, imaginou-se que o íon nitrito (NO_2^-) seria um metabólito fisiologicamente inerte. Hoje, sabe-se que ele pode ser uma fonte de óxido nítrico (NO) endógeno, através da ação de enzimas nitrito redutases em condições de hipóxia (MAIA; MOURA, 2014; SHIVA, 2013). Nitrito Redutases são enzimas muito importante no processo de desnitrificação, tendo implicações desde agricultura até a degradação da camada de ozônio. São conhecidos dois grandes grupos de nitrito redutases de acordo com seus sítios ativos: enzimas com centro metálico de cobre e enzimas contendo o grupo heme (SOUSA; CAREPO; MOURA, 2020). Ocorrendo a redução de nitrito a óxido nítrico (Figura 47), a ligação do NO a hemeproteínas na forma ferrosa (Fe^{2+}) é facilmente identificada por espectroscopia de absorção eletrônica, dado que suas bandas Soret e Qs são bastante características quando formadas (WITTING; DOUGLAS; MAUK, 2001).

Figura 47 - Representação esquemática da redução do nitrito catalisada por heme enzima.

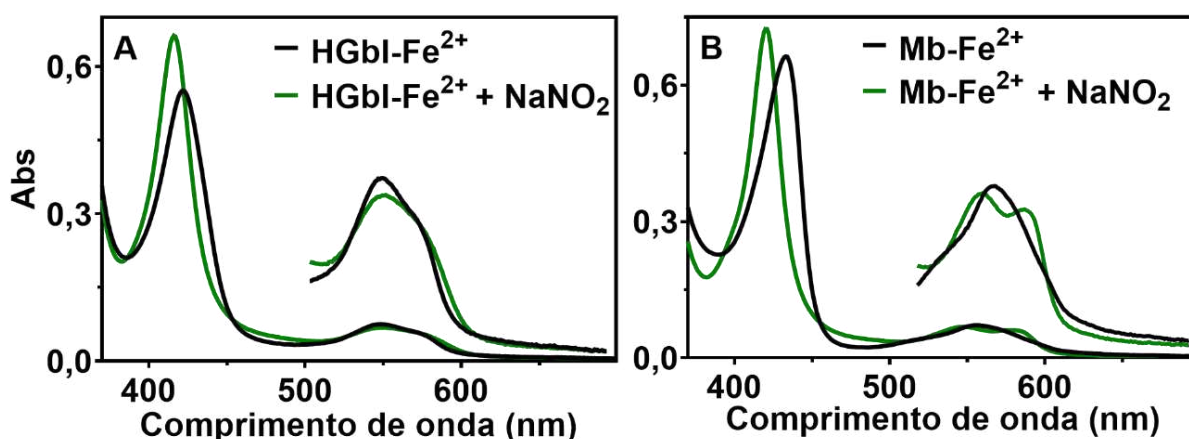


Fonte: o autor.

Tendo isso em mente, foram planejados experimentos que pudessem investigar se a HGbI apresentaria atividade de NO_2^- redutase. A proteína foi submetida a condições anaeróbicas junto com o substrato (NO_2^-) na presença do agente redutor

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, tal como descrito na literatura (LIM *et al.*, 2019), e a possível formação de NO foi acompanhada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Em paralelo a isso, foi avaliada a ligação direta da HgbI com NO empregando-se o composto liberador de óxido nítrico dietilamina NONOato de sódio. Como controle, os mesmos experimentos foram realizados com a mioglobina. A função principal e mais conhecida da mioglobina é o armazenamento de O_2 em tecidos musculares. Contudo, há menos de duas décadas, foi descoberto que, em condições de baixas concentrações de oxigênio, a deoxi-Mb é capaz de reduzir NO_2^- a NO (SHIVA *et al.*, 2007). Na Figura 48 estão apresentados os espectros eletrônicos na região do UV-Vis das proteínas HgbI e Mb reduzidas (Fe^{2+}) e submetidas a incubação com NO_2^- após 20 min.

Figura 48 - Espectros eletrônicos no UV-Vis das proteínas HgbI e Mb reduzidas e em presença de NO_2^- . A) HgbI + NaNO_2 ; B) Mb + NaNO_2 ; a concentração das proteínas foi $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão 10 mmol L^{-1} , 150 mmol L^{-1} NaCl pH 7,2; $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 1 mmol L^{-1} NaNO_2 .

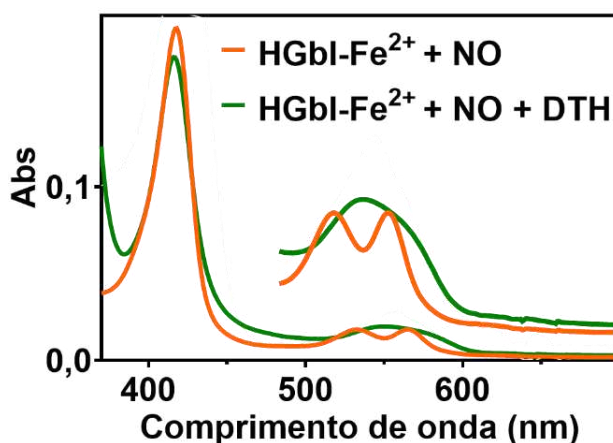


Fonte: o autor.

O ensaio controle com Mb mostrou que há uma formação consistente de Mb ligada ao NO, com feições espectroscópicas típicas (FOLEY *et al.*, 2022). A mudança espectral observada após a incubação com nitrito, especificamente, o deslocamento da banda *Soret* de 422 nm para 416 nm (Figura 48-A), sugere reação e possivelmente a formação de HgbI ligada ao NO. Contudo, o perfil das bandas Q não condiz com o

reportado na literatura, que seria o mesmo obtido neste trabalho após incubação da proteína reduzida com o liberador de NO e pode ser visto na Figura 49. Assim, surge a possibilidade de que haja outra espécie ligando-se à HGBI, sendo HNO uma forte candidata. De fato, o perfil do espectro eletrônico observado na região das bandas Q se assemelha bastante ao perfil da Mb ligada ao HNO (KUMARS *et al.*, 2010).

Figura 49 - Espectros eletrônicos no UV-Vis da HGBI-Fe²⁺ após ser incubada com liberador de NO (dietilamina NONOato de sódio) e após adição de ditionito de sódio (DTH).



Fonte: o autor.

Há alguns anos descobriu-se que HNO/NO⁻ (nitroxil/nitróxido) desempenha funções importantes em processos biológicos, tais como relaxamento vascular e regulação neurológica (FUKUTO *et al.*, 2005, 2008). O envolvimento do HNO com heme proteínas tem sido alvo de estudos na investigação dos processos de desnitrificação realizados por redutases de nitrito e óxido nítrico em plantas, bactérias e fungos. Peroxidases, NO sintetases e citocromo P450 também apresentam indícios de que HNO participa como intermediário em seus ciclos catalíticos (HUANG *et al.*, 2002; LEHNERT; PRANEETH; PAULAT, 2006; RUSCHE; SPIERING; MARLETTA, 1998). Além disso, várias heme proteínas, dentre as quais mioglobina e hemoglobina, são usadas como *scavengers* de HNO (MIRANDA, 2005). O aduto Mb-Fe²⁺-HNO pode ser obtido pela adição de HNO a proteína deoxi (Mb-Fe²⁺) ou pela redução de Mb-Fe²⁺-NO (KUMARS *et al.*, 2010). Por sua vez, a formação da mioglobina ligada ao NO

pode ser conseguida pela incubação da proteína met (Mb-Fe³⁺) com NaNO₂ e ditionito de sódio (Na₂S₂O₄).

O potencial de redução do Na₂S₂O₄ (-0,66 V vs ENH)(MAYHEW, 1978) não é suficiente para reduzir NO livre a HNO (-0,68 V vs ENH) (BARTBERGER *et al.*, 2002), ou mesmo quando está ligado a Mb. Contudo a ligação do óxido nítrico a HgbI poderia elevar seu E_{red} , de modo que fosse possível sua redução a HNO. É interessante observar que a proteína na forma Fe²⁺-NO após adição de ditionito de sódio (Figura 49) adquire perfil espectral idêntico ao da proteína que foi encubada com NaNO₂ e o agente redutor em excesso.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos por dicroísmo circular foram importantes para indicar a manutenção da estrutura secundária da proteína quando o estado de oxidação de seu centro metálico muda. Todavia, aparentemente, ambientes ácidos (pH 5,5) favorecem a formação de estruturas mais desordenadas; ainda que o percentual de α -hélices praticamente não varie. Essa técnica mostrou ainda que a estrutura terciária da HGbI é fortemente influenciada pelo estado de oxidação do íon ferro do grupo heme. Os resultados de dicroísmo circular indicam mudanças no microambiente que rodeia o grupo prostético. Os estudos por fluorescência indicam que na forma reduzida (HGbI-Fe²⁺) os resíduos de triptofanos da estrutura se encontram mais protegidos no interior da matriz proteica. Esse efeito poderia ser inclusive decorrente da formação de uma estrutura quaternária (dímero).

Estudos ácido-base indicaram que a HGbI não se liga ao íon hidróxido em altos pHs, como observados em várias outras globinas. Além disso as mudanças espectrais na banda Soret e Q, em decorrência da variação de pH, sugerem mudança no sexto ligante coordenado ao Fe³⁺. Não menos relevante, confirmou-se a alta estabilidade da proteína quanto a perda do heme em pH próximo a 4 (algo já previamente descrito na literatura).

A proteína mostrou-se estável em soluções contendo elevadas concentrações de solventes como DMSO e metanol, valores de 30 e 50%, respectivamente. A análise da estabilidade térmica da HGbI quanto a preservação de sua estrutura secundária, acessada por meio de dicroísmo circular, revelou T_m de 71 e 81°C nos pH 5,5 e 7,0, respectivamente. Em pH 7,0, não foram observadas diferenças de estabilidade térmica entre as formas oxidada (met-HGbI) e reduzida (oxi-HGbI). Contudo, em pH 5,5, a forma reduzida mostrou-se mais susceptível a desnaturação que a forma oxidada em temperaturas superiores a 65°C. A forma oxidada também apresentou estabilidade térmica superior quanto a estrutura terciária e sua ligação ao grupo heme. Com respeito a maior estabilidade da ligação do grupo prostético, esse efeito pode ser atribuído a coordenação a dois resíduos internos da proteína, enquanto que a forma reduzida exposta ao ar temos uma das posições axiais do ferro ocupada por uma molécula de O₂.

A eficiente remoção do grupo prostético heme da HGbI foi confirmada pelas técnicas de UV-Vis, CD e fluorescência. A qual foi plenamente reconstituída pela

adição de hemina a *apo* proteína. Infelizmente, não houve sucesso na incorporação de um ftalocianina de níquel, possivelmente devido ao seu tamanho e ausência de grupos carregados, entretanto, outras incorporações de grupos prostéticos devem ser investigadas.

A proteína apresentou cinéticas de associação a cianeto da mesma ordem de grandeza da neuroglobina humana, reforçando sua semelhança estrutural e funcional. Essa cinética é bem mais lenta do que observado em outras globinas em geral, e uma explicação para isso seria que assim como nas Ngb, na HGbl a entrada do CN⁻ envolve uma etapa de dissociação do ligante interno com alta afinidade.

Os ensaios de filtração em gel analítico mostraram claramente diferenças entre as formas reduzida e oxidada da proteína, os quais foram sugestivos de que a HGbl experimente um equilíbrio monômero-dímero. Mudanças conformacionais, ao nível de estrutura terciária, para causar tal perfil são pouco prováveis diante de outras evidências cumulativas. A dependência de tal processo em relação a concentração de proteína é um indicativo de que se trate um fenômeno de oligomerização. Nesse caso, o monômero é composto pela forma Fe³⁺, enquanto que na forma Fe²⁺, há um equilíbrio entre dímero e monômero.

Os ensaios explorativos de atividade catalítica foram bastante interessantes. Infelizmente, a atividade peroxidase a HGbl mostrou-se pouco promissora na sua forma nativa. Isso pode estar relacionado a ausência dos aminoácidos histidina e aspartato rodeando o sítio distal hémico da proteína, onde deve ocorrer a catálise; uma vez que esses aminoácidos são descritos como essenciais para tais catálises. Há uma necessidade de se avaliar mutantes na cavidade hémica da HGbl e investigar *docking* de outros substratos a fim de compreender melhor tais processos e eventualmente indicar estratégia de preparo de um novo biocatalisador, em analogia ao que se vem fazendo com a mioglobina. Com respeito a nitrito redutase, a HGbl apresentou atividade. No entanto um fenômeno diferente foi observado do que é visto como a mioglobina, que merece futuros estudos. Apesar da baixa atividade catalítica observada, convém reforçar que essa proteína é bastante robusta e capaz de se manter íntegra sob condições expressivamente ácidas, altas temperaturas e mesmo na presença de altas concentrações de solvente orgânico. Essas propriedades em si já a tornam um atrativo modelo para otimizações catalíticas futuras, seja por mutações planejadas e ou alteração de grupo prostético.

REFERÊNCIAS

- ADAR, F. Electronic Absorption Spectra of Hemes and Hemoproteins. *Em: DOLPHIN, D. The Porphyrins*. [s.l: s.n.]p. 167–209.
- ALAM, S. S. and P. A. Transformation efficiency on *E. coli* in response to different bivalent salts. **Journal of Research in Biology**, v. 2, n. 8, p. 704–710, 2012.
- ASCENZI, P.; DI MASI, A.; LEBOFFE, L.; FIOCCHETTI, M.; NUZZO, M. T.; BRUNORI, M.; MARINO, M. **Neuroglobin: From structure to function in health and disease***Molecular Aspects of Medicine*Elsevier Ltd, 1 dez. 2016.
- BARTBERGER, M. D.; LIU, W.; FORD, E.; MIRANDA, K. M.; SWITZER, C.; FUKUTO, J. M.; FARMER, P. J.; WINK, D. A.; HOUK, K. N. **The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry**. [s.l.] PNAS, 2002. . Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162095599>.
- BOLOGNESI, M.; BORDO, D.; RIZZI, M.; TARRICONET, C.; ASCENZI, P. Nonvertebrate Hemoglobins: Structural Bases for Reactivity. **Prog. Biophys. molec. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 29–68, 1997.
- BORDEAUX, M.; SINGH, R.; FASAN, R. Intramolecular C(sp³)-H amination of arylsulfonyl azides with engineered and artificial myoglobin-based catalysts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 20, p. 5697–5704, 2014.
- BORDEAUX, M.; TYAGI, V.; FASAN, R. Highly Diastereoselective and Enantioselective Olefin Cyclopropanation Using Engineered Myoglobin-Based Catalysts. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, p. 1744–1748, 2015.
- BRANCACCIO, A.; CUTRUZZOLÁ, F.; ALLOCATELLI, C. T.; BRUNORI, M.; SMERDON, S. J.; WILKINSON, A. J.; DOU, Y.; KEENAN, D.; IKEDA-SAITO, M.; BRANTLEY, R. E.; OLSON, J. S. Structural factors governing azide and cyanide binding to mammalian metmyoglobins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13843–13853, 13 maio 1994.
- BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKEIN, T. A vertebrate globin expressed in the brain. **Nature**, v. 407, p. 520–523, 2000.
- CAI, Y.; YAO, S.; HU, M.; LIU, X.; ZHANG, J. Manganese protoporphyrin IX reconstituted myoglobin capable of epoxidation of the C=C bond with oxone. **Inorganic Chemistry Frontiers**, 2016.
- CHO, I.; PRIER, C. K.; JIA, Z. J.; ZHANG, R. K.; GÖRBE, T.; ARNOLD, F. H. Enantioselective Aminohydroxylation of Styrenyl Olefins Catalyzed by an Engineered Hemoprotein. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 58, n. 10, p. 3138–3142, 2019.
- COELHO, P. S.; BRUSTAD, E. M.; KANNAN, A.; ARNOLD, F. H. Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes. **Scienceexpress**, p. 1–6, 2012.

D'ANNA, J. A.; TOLLIN, G. Studies of Flavin-Protein Interaction in Flavoproteins Using Protein Fluorescence and Circular Dichroism. **Biochemistry**, v. 11, n. 6, p. 1073–1080, 1972.

DICKERSON, V. R. E.; BENJAMIN, I. G. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology. **Angew. Chem**, v. 96, n. 12, p. 1003–1004, 1984.

DING, F.; LIU, W.; SUN, Y.; SUN, Y.; YANG, X. L.; ZHANG, L. Analysis of conjugation of chloramphenicol and hemoglobin by fluorescence, circular dichroism and molecular modeling. **Journal of Molecular Structure**, v. 1007, p. 81–87, 11 jan. 2012.

DUFF, S. M. G.; WITTENBERG, J. B.; HILL, R. D. Expression, purification, and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin. Optical spectra and reactions with gaseous ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 27, p. 16746–16752, 4 jul. 1997.

DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L. E.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature Letters**, v. 450, n. 118, p. 879–883, 2007.

ERICKSON, H. P. **Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy** **Biological Procedures Online** 2009.

ESLAMI-FARSANI, R.; FARHADIAN, S.; SHAREGHI, B.; ASGHARZADEH, S. Structural change of myoglobin structure after binding with spermidine. **Journal of Molecular Liquids**, v. 352, 15 abr. 2022.

FANCY, D. A.; DENISON, C.; KIM, K.; XIE, Y.; HOLDEMAN, T.; AMINI, F.; KODADEK, T. **Scope, limitations and mechanistic aspects of the photo-induced cross-linking of proteins by water-soluble metal complexes**. [s.l: s.n.].

FARWELL, C. C.; ZHANG, R. K.; MCINTOSH, J. A.; HYSTER, T. K.; ARNOLD, F. H. Enantioselective enzyme-catalyzed aziridination enabled by active-site evolution of a cytochrome P450. **ACS Central Science**, v. 1, n. 2, p. 89–93, 2015.

FOLEY, E. L.; HVITVED, A. N.; EICH, R. F.; OLSON, J. S. **Mechanisms of nitric oxide reactions with globins using mammalian myoglobin as a model system** **Journal of Inorganic Biochemistry** Elsevier Inc., 1 ago. 2022.

FORNERA, S.; WALDE, P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o -phenylenediamine. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 2, p. 293–295, 2010a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.034>>.

FORNERA, S.; WALDE, P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o -phenylenediamine. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 2, p. 293–295, 2010b.

FUKUTO, J. M.; BARTBERGER, M. D.; DUTTON, A. S.; PAOLOCCI, N.; WINK, D. A.; HOUK, K. N. **The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): The neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide** *Chemical Research in Toxicology* 2005.

FUKUTO, J. M.; JACKSON, M. I.; KALUDERCIC, N.; PAOLOCCI, N. **Examining Nitroxyl in Biological Systems** *Methods in Enzymology* 2008.

GALLUCCIO, M.; PINGITORE, P.; SCALISE, M.; INDIVERI, C. Cloning, Large Scale Over-Expression in *E. coli* and Purification of the Components of the Human LAT 1 (SLC7A5) Amino Acid Transporter. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 442–448, 2013.

GOBER, J. G.; BRUSTAD, E. M. ScienceDirect Non-natural carbenoid and nitrenoid insertion reactions catalyzed by heme proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 124–132, 2016.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2876–2890, 2006.

GUO, C.; CHADWICK, R. J.; FOULIS, A.; BEDENDI, G.; LUBSKYY, A.; RODRIGUEZ, K. J.; PELLIZZONI, M. M.; MILTON, R. D.; BEVERIDGE, R.; BRUNS, N. Peroxidase Activity of Myoglobin Variants Reconstituted with Artificial Cofactors. **ChemBioChem**, v. 23, n. 18, 16 set. 2022.

HAMDANE, D.; KIGER, L.; DEWILDE, S.; UZAN, J.; BURMESTER, T.; HANKELN, T.; MOENS, L.; MARDEN, M. C. Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin. **FEBS Journal**, v. 272, n. 8, p. 2076–2084, abr. 2005.

HANKELN, T.; BURMESTER, T. Neuroglobin and Cytoglobin. *Em*: GHOSH, A. **The Smallest Biomolecules Diatomics and their Interactions with Heme Proteins**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2008. p. 627.

HASEGAWA, J.; LEHNERT, N.; HAYASHI, T. Catalytic Cyclopropanation by Myoglobin Reconstituted with Iron Porphycene: Acceleration of Catalysis due to Rapid Formation of the Carbene Species. p. 17265–17268, 2017.

HAYASHI, T.; HITOMI, Y.; ANDO, T.; MIZUTANI, T.; HISAEDA, Y. Peroxidase Activity of Myoglobin Is Enhanced by Chemical Mutation of Heme-Propionates. n. 9, p. 7747–7750, 1999.

HEROLD, S.; FAGO, A.; WEBER, R. E.; DEWILDE, S.; MOENS, L. Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 22841–22847, 2004.

HIRSCH, R. E. Heme-Protein Fluorescence. *Em*: LAKOWICZ, J. R. **Topics in Fluorescence Spectroscopy**. New York: Plenum, 2002. p. 221–255.

HOU, S.; MAKAROVA, K. S.; SAW, J. H. W.; SENIN, P.; LY, B. V.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; GALPERIN, M. Y.; OMELCHENKO, M. V.; WOLF, Y. I.; YUTIN, N.; KOONIN, E. V.; STOTT, M. B.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; SMIRNOVA, A.

V; DUNFIELD, P. F.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylococcus infernus*, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. **Biology Direct**, v. 25, p. xx–xx, 2008.

HU, C.; CHEN, Y. **Biomolecule-compatible chemical bond-formation and bond-cleavage reactions induced by visible light** *Tetrahedron Letters* Elsevier Ltd, 11 fev. 2015.

HUANG, J.; SOMMERS, E. M.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 13, p. 3473–3480, 3 abr. 2002.

HUNTLEY, T. E.; STRITTMATTER, P. The effect of heme binding on the tryptophan residue and the protein conformation of cytochrome b 5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 14, p. 4641–4647, 1972.

INAGAKI, S.; MASUDA, C.; AKAISHI, T.; NAKAJIMA, H.; YOSHIOKA, S.; OHTA, T.; PAL, B.; KITAGAWA, T.; AONO, S. Spectroscopic and redox properties of a CooA homologue from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3269–3274, 4 fev. 2005.

IOANOVICHI, A.; YUKL, E. T.; MOËNNE-LOCCOZ, P.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. DevS, a heme-containing two-component oxygen sensor of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 46, n. 14, p. 4250–4260, 10 abr. 2007.

JENKINS, J. M. X.; NOBLE, C. E. M.; GRAYSON, K. J.; MULHOLLAND, A. J.; ANDERSON, J. L. R. Substrate promiscuity of a de novo designed peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 217, 1 abr. 2021.

JESCHEK, M.; PANKE, S.; WARD, T. R. Artificial Metalloenzymes on the Verge of New-to-Nature Metabolism. v. 36, n. 1, 2018.

JONES, D. K.; BADI, R.; ROSELL, F. I.; LLOYD, E. **Bacterial expression and spectroscopic characterization of soybean leghaemoglobin a** *Biochem. J.* [s.l.: s.n.].

KENDREW, J. C. Myoglobin and the Structure of Proteins. **Science**, v. 139, p. 1259–1266, 1963.

KENDREW, J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**, v. 181, p. 662–666, 1958.

KEY, H. M.; DYDIO, P.; CLARK, D. S.; HARTWIG, J. F. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron. **Nature**, v. 534, n. 7608, p. 534–537, 13 jun. 2016.

KIGER, L.; UZAN, J.; DEWILDE, S.; BURMESTER, T.; HANKELN, T.; MOENS, L.; HAMDANE, D.; BAUDIN-CREUZA, V.; MARDEN, M. C. Neuroglobin ligand binding kinetics. **IUBMB Life**, v. 56, n. 11–12, p. 709–719, 2004.

KIM, T.; KASSIM, A. M.; BOTEJUE, A.; ZHANG, C.; FORTE, J.; ROZZELL, D.; HUFFMAN, M. A.; DEVINE, P. N.; MCINTOSH, J. A. Hemoprotein-Catalyzed Cyclopropanation En Route to the Chiral Cyclopropanol Fragment of Grazoprevir. **ChemBioChem**, v. 20, n. 9, p. 1129–1132, 2019.

KITANISHI, K.; KOBAYASHI, K.; UCHIDA, T.; ISHIMORI, K.; IGARASHI, J.; SHIMIZU, T. Identification and functional and spectral characterization of a globin-coupled histidine kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35522–35534, 14 out. 2011.

KUMARS, M. R.; FUKUTO, J. M.; MIRANDA, K. M.; FARMER, P. J. Reactions of HNO with heme proteins: New routes to HNO-heme complexes and insight into physiological effects. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 14, p. 6283–6292, 19 jul. 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence Spectroscopy**. [s.l.: s.n.]954 p.

LEHNERT, N.; PRANEETH, V. K. K.; PAULAT, F. Electronic structure of iron(II)-porphyrin nitroxyl complexes: Molecular mechanism of fungal nitric oxide reductase (P450nor). **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 1338–1351, set. 2006.

LEWIS, U. J. Acid cleavage of heme proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 206, p. 109–120, 1954.

LI, L.; YUAN, H.; LIAO, F.; HE, B.; GAO, S.; WEN, G.; TAN, X.; LIN, Y. Rational design of artificial dye-decolorizing peroxidases using myoglobin by engineering Tyr/Trp in the heme center. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 11230–11238, 2017.

LIAO, F.; HE, B.; DU, K.-J.; GAO, S.-Q.; WEN, G.; LIN, Y.-W. Enhanced Dehaloperoxidase Activity of F43Y Myoglobin with a Novel Tyrosine Heme Crosslink. **Chemical Letters - The Chemical Society of Japan**, v. 45, p. 1087–1089, 2016.

LIM, Y. J.; FOO, T. C.; YEUNG, A. W. S.; TU, X.; MA, Y.; HAWKINS, C. L.; WITTING, P. K.; JAMESON, G. N. L.; TERENTIS, A. C.; THOMAS, S. R. Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Is an Efficient Mammalian Nitrite Reductase. **Biochemistry**, v. 58, n. 7, p. 974–986, 2019.

LONG, A.; ROTHENBERG, P.; PATEL, D.; MACDOUGALL, J.; HARTINGS, M. R. The structure and peroxidase activity of myoglobin in alcoholic solvents. **Polyhedron**, v. 114, p. 138–144, 2016.

MAIA, L. B.; MOURA, J. J. G. **How biology handles nitrite** **Chemical Reviews** American Chemical Society, 28 maio 2014.

MAYHEW, S. G. The Redox Potential of Dithionite and SO₂ from Equilibrium Reactions with Flavodoxins, Methyl Viologen and Hydrogen plus Hydrogenase. **European Journal of Biochemistry**, v. 85, n. 2, p. 535–547, 1978.

MINTOROVITCH, J.; VAN PELT, D.; SATTERLEE, J. D. Kinetic Study of the Slow Cyanide Binding to Glycera dibranchiata Monomer Hemoglobin Components III and IV. **Biochemistry**, v. 28, n. 14, p. 6099–6104, 1989.

- MIRANDA, K. M. **The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology** *Coordination Chemistry Reviews* fev. 2005.
- NATOLI, S. N.; HARTWIG, J. F. Noble – Metal Substitution in Hemoproteins : An Emerging Strategy for Abiological Catalysis. 2018.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER Principles of Biochemistry**. [s.l.] W. H. Freeman, 2004. 1119 p.
- OOHORA, K.; KIHARA, Y.; MIZOHATA, E.; INOUE, T.; HAYASHI, T. C(sp³) – H Bond Hydroxylation Catalyzed by Myoglobin Reconstituted with Manganese Porphycene. p. 4–7, 2013.
- ORDWAY, G. A.; GARRY, D. J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 20, p. 3441–3446, 2004.
- OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Em: Principles of Organic Chemistry*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 371–396.
- OZAKI, S.; HARA, I.; MATSUI, T.; WATANABE, Y. Molecular Engineering of Myoglobin : The Improvement of Oxidation Activity by Replacing Phe-43 with Tryptophan. **Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1044–1052, 2001a.
- OZAKI, S. I.; HARA, I.; MATSUI, T.; WATANABE, Y. Molecular engineering of myoglobin: The improvement of oxidation activity by replacing Phe-43 with tryptophan. **Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1044–1052, 30 jan. 2001b.
- OZAKI, S.; MATSUI, T.; WATANABE, Y. Conversion of Myoglobin into a Peroxygenase: A Catalytic Intermediate of Sulfoxidation and Epoxidation by the F43H/H64L Mutant. **Journal of American Chemical Society**, v. 7863, n. 9, p. 6666–6667, 1997.
- OZAKI, S.; YANG, H.; MATSUI, T. Asymmetric oxidation catalyzed by myoglobin mutants. v. 10, p. 183–192, 1999.
- PECHKOVA, E.; SCUDIERI, D.; BELMONTE, L.; NICOLINI, C. Oxygen-bound hell's gate globin i by classical versus LB nanotemplate method. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2543–2548, jul. 2012.
- PETERSEN, M. G.; DEWILDE, S.; FAGO, A. Reactions of ferrous neuroglobin and cytoglobin with nitrite under anaerobic conditions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 9, p. 1777–1782, set. 2008.
- PHANE MEUNIER, S.; STRABLE, E.; FINN, M. G. Crosslinking of and Coupling to Viral Capsid Proteins by Tyrosine Oxidation installation of functional molecules at well-defined loca-tions [7-9]. CPMV particles are remarkably stable: they maintain their integrity for several days at room tempera. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 319–326, 2004.
- POTTER, H.; HELLER, R. Transfection by Electroporation. **Curr Protoc Mol Biol**, p. 1–12, 2003.

REEDY, C. J.; GIBNEY, B. R. **Heme Protein Assemblies***Chemical Reviews*fev. 2004.

REETZ, M. T. Directed Evolution of Artificial Metalloenzymes: A Universal Means to Tune the Selectivity of Transition Metal Catalysts ? **Accountns of Chemical Research**, v. 52, n. 2, p. 336–344, 2019.

RIBEIRO, E. A.; REGIS, W. C. B.; TASIC, L.; RAMOS, C. H. I. Fast purification of the apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 1, p. 202–208, 2003.

RUSCHE, K. M.; SPIERING, M. M.; MARLETTA, M. A. Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. **Biochemistry**, v. 37, n. 44, p. 15503–15512, 3 nov. 1998.

SCHMID, F.-X. **Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry***Encyclopedia of Life Sciences*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.els.net>.

SCHMIDT, P.; SCHRAMM, M.; SCHRODER, H.; STASCH, J.-P. Preparation of heme-free soluble guanylate cyclase. **Protein Expression and Purification**, v. 31, p. 42–46, 2003.

SCHWIZER, F.; OKAMOTO, Y.; HEINISCH, T.; GU, Y.; PELLIZZONI, M. M.; LEBRUN, V.; REUTER, R.; KÖHLER, V.; LEWIS, J. C.; WARD, T. R. Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 1, p. 142–231, 2018.

SHIVA, S. Nitrite : A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 40–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.005>>.

SHIVA, S.; HUANG, Z.; GRUBINA, R.; SUN, J.; RINGWOOD, L. A.; MACARTHUR, P. H.; XU, X.; MURPHY, E.; DARLEY-USMAR, V. M.; GLADWIN, M. T. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. **Circulation Research**, v. 100, n. 5, p. 654–661, mar. 2007.

SOUSA, E. H. S.; CAREPO, M. S. P.; MOURA, J. J. G. **Nitrate-nitrite fate and oxygen sensing in dormant Mycobacterium tuberculosis: A bioinorganic approach highlighting the importance of transition metals***Coordination Chemistry Reviews*Elsevier B.V., 15 nov. 2020.

SOUZA, L. H. C.; GUIMARÃES, W. G.; SOUSA, E. H. S.; DIÓGENES, I. C. N. Redox potential determination of the Hell's gate globin I protein facing multiple exogenous ligands. **Microchemical Journal**, p. 108027, dez. 2022.

SPIZIZEN, J. Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. **Proc. N. A. S.**, v. 44, p. 1072–1078, 1968.

SREENILAYAM, G.; FASAN, R. Myoglobin-catalyzed intermolecular carbene N – H. **Chemical Communications**, 2014.

- SREENILAYAM, G.; FASAN, R. Myoglobin-catalyzed intermolecular carbene N – H. **Chemical Communications**, v. 51, p. 1532–1534, 2015.
- TANAKA, M.; ISHIMORI, K.; MUKAI, M.; KITAGAWA, T.; MORISHIMA, I. Catalytic Activities and Structural Properties of Horseradish Peroxidase Distal His42 f Glu or Gln Mutant †. v. 2960, n. 97, p. 9889–9898, 1997.
- TANG, Z. Y.; YU, J. Y.; ZHOU, Q.; HE, B.; WANG, Z. F.; ZHOU, H. M. Secondary structure of holo- and apo-aminoacylase from prediction, circular dichroism, and FT- raman spectroscopy. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 4, p. 706–709, 1995.
- TEALE, F. W. J. Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 35, p. 543, 1959.
- TEH, A.; SAITO, J. A.; BAHARUDDIN, A.; TUCKERMAN, J. R.; NEWHOUSE, J. S.; KANBE, M.; NEWHOUSE, E. I.; ABDUL, R.; FAVIER, F.; DIDIERJEAN, C.; SOUSA, E. H. S.; STOTT, M. B.; DUNFIELD, P. F.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M.; NAJIMUDIN, N.; ALAM, M. Hell ' s Gate globin I : An acid and thermostable bacterial hemoglobin resembling mammalian neuroglobin. **FEBS Letters**, v. 585, n. 20, p. 3250–3258, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.002>>.
- TINOCO, A.; STECK, V.; TYAGI, V.; FASAN, R. Highly Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Tri fl uoromethyl- Substituted Cyclopropanes via Myoglobin-Catalyzed Transfer of Tri fl uoromethylcarbene. p. 7–10, 2017.
- TYAGI, V.; SREENILAYAM, G.; BAJAJ, P.; TINOCO, A.; FASAN, R. Biocatalytic Synthesis of Allylic and Allenyl Sulfides through a Myoglobin-Catalyzed Doyle – Kirmse Reaction. p. 13562–13566, 2016.
- UPPAL, S.; KUMAR, A.; SHANDILYA, M.; MUKHI, N.; SINGH, A. K.; KATERIYA, S.; KAUR, J.; KUNDU, S. Penta- and hexa-coordinate ferric hemoglobins display distinct pH titration profiles measured by Soret peak shifts. **Analytical Biochemistry**, v. 510, p. 120–128, 1 out. 2016.
- VAN KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRAT, W. G. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 23, p. 199–257, 1983.
- VARGAS, D. A.; TINOCO, A.; TYAGI, V.; FASAN, R. Myoglobin-Catalyzed C-H Functionalization of Unprotected Indoles. p. 9911–9915, 2018.
- WARD, T. R. Directed Evolution of Iridium-Substituted Myoglobin Affords Versatile Artificial Metalloenzymes for Enantioselective C-C Bond-Forming Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, p. 14909–14911, 2016.
- WATANABE, S.; TAKAHASHI, N.; UCHIDA, H.; WAKASUGI, K. Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30128–30138, 31 ago. 2012.
- WATANABE, Y. Construction of heme enzymes : four approaches Yoshihito Watanabe. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 208–216, 2002.

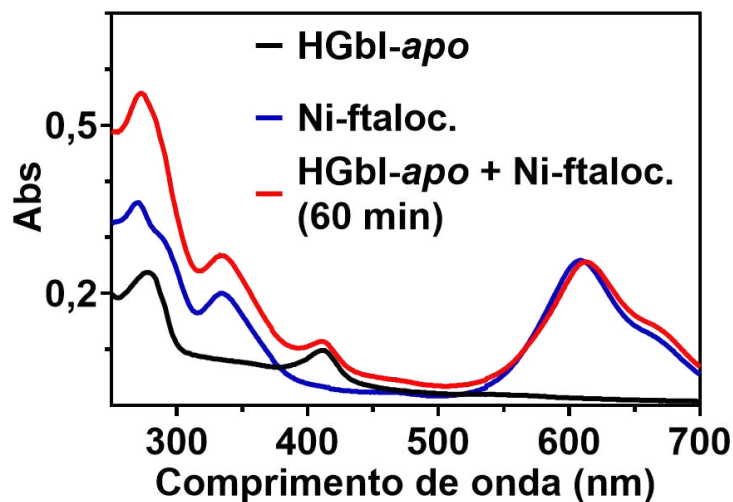
- WATANABE, Y.; UENO, T. Introduction of P450 , Peroxidase , and Catalase Activities into Myoglobin by Site-Directed Mutagenesis : Diverse Reactivities of Compound I. **The Chemical Society of Japan**, v. 76, p. 1309–1322, 2003.
- WEI, Y.; ANG, E. L.; ZHAO, H. Recent developments in the application of P450 based biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 43, p. 1–7, 2018.
- WENSIEN, M.; VON PAPPENHEIM, F. R.; FUNK, L. M.; KLOSKOWSKI, P.; CURTH, U.; DIEDERICHSEN, U.; URANGA, J.; YE, J.; FANG, P.; PAN, K. T.; URLAUB, H.; MATA, R. A.; SAUTNER, V.; TITTMANN, K. A lysine–cysteine redox switch with an NOS bridge regulates enzyme function. **Nature**, v. 593, n. 7859, p. 460–464, 20 maio 2021.
- WIESZCZYCKA, K.; STASZAK, K. Artificial metalloenzymes as catalysts in non-natural compounds synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 160–171, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.012>>.
- WISSBROCK, A.; GEORGE, A. A. P.; BREWITZ, H. H.; KÜHL, T.; IMHOF, D. **The molecular basis of transient heme-protein interactions: Analysis, concept and implementation** *Bioscience Reports* Portland Press Ltd, 30 jan. 2019.
- WITTENBERG, J. B.; WITTENBERG, B. A. Myoglobin function reassessed. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 12, p. 2011–2020, 2003.
- WITTING, P. K.; DOUGLAS, D. J.; MAUK, A. G. Reaction of Human Myoglobin and Nitric Oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3991–3998, 2001.
- WOLF, M. W.; VARGAS, D. A.; LEHNERT, N. Engineering of RuMb : Toward a Green Catalyst for Carbene Insertion Reactions. **Inorganic Chemistry**, v. 56, p. 5623–5635, 2017.
- WOOD, P. M. Bacterial proteins with co-binding b- or c-type haem: Functions and absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 768, p. 293–317, 1984.
- XIA, J.; ZUO, J.; LI, H. Single molecule force spectroscopy reveals that the oxidation state of cobalt ions plays an important role in enhancing the mechanical stability of proteins. **Nanoscale**, v. 11, n. 42, p. 19791–19796, 14 nov. 2019.
- YANG, H.; MATSUI, T.; OZAKI, S.; KATO, S.; UENO, T.; PHILLIPS, G. N.; FUKUZUMI, S.; WATANABE, Y. Molecular Engineering of Myoglobin : Influence of Residue 68 on the Rate and the Enantioselectivity of Oxidation Reactions Catalyzed by H64D / V68X Myoglobin †. p. 10174–10181, 2003.
- YIN, L.-L.; YUAN, H.; LIU, C.; HE, B.; GAO, S.-Q.; WEN, G.-B.; TAN, X.; LIN, Y.-W. A Rationally Designed Myoglobin Exhibits a Catalytic Dehalogenation Efficiency More than 1000-Fold That of a Native Dehaloperoxidase. **ACS Catalysis**, v. 8, p. 9619–9624, 2018a.
- YIN, L.-L.; YUAN, H.; LIU, C.; HE, B.; GAO, S.-Q.; WEN, G.-B.; TAN, X.; LIN, Y.-W. A Rationally Designed Myoglobin Exhibits a Catalytic Dehalogenation Efficiency

More than 1000-Fold That of a Native Dehaloperoxidase. **ACS Catalysis**, v. 8, p. 9619–9624, 2018b.

ZHANG, J.; ZHANG, X.; WU, C.; LU, D.; GUO, G.; MAO, X.; ZHANG, Y.; WANG, D. C.; LI, D.; ZOU, Q. Expression, purification and characterization of arginase from helicobacter pylori in its apo form. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–8, 2011.

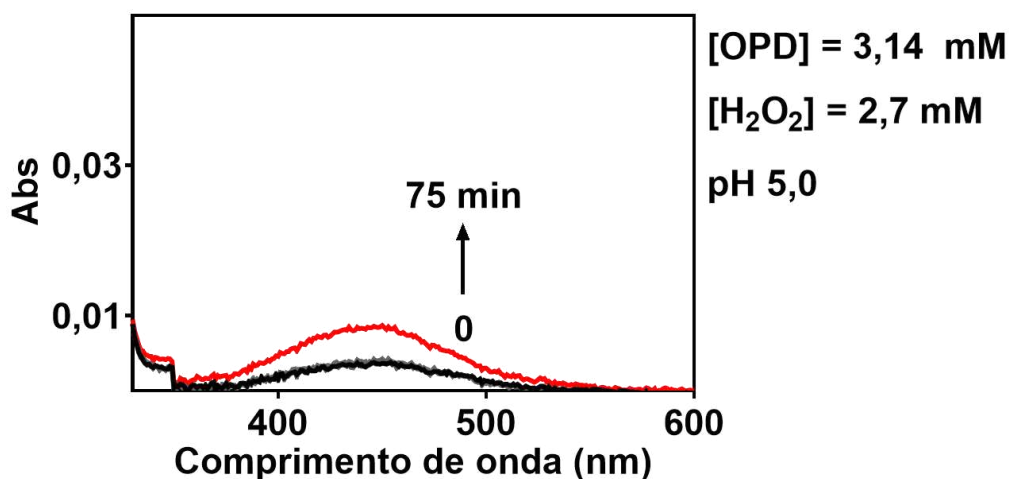
ANEXO A - ESPECTROS DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA COMPLEMENTARES

Figura I – Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da HGbl-*apo* em incubação com ftalocianina de níquel.



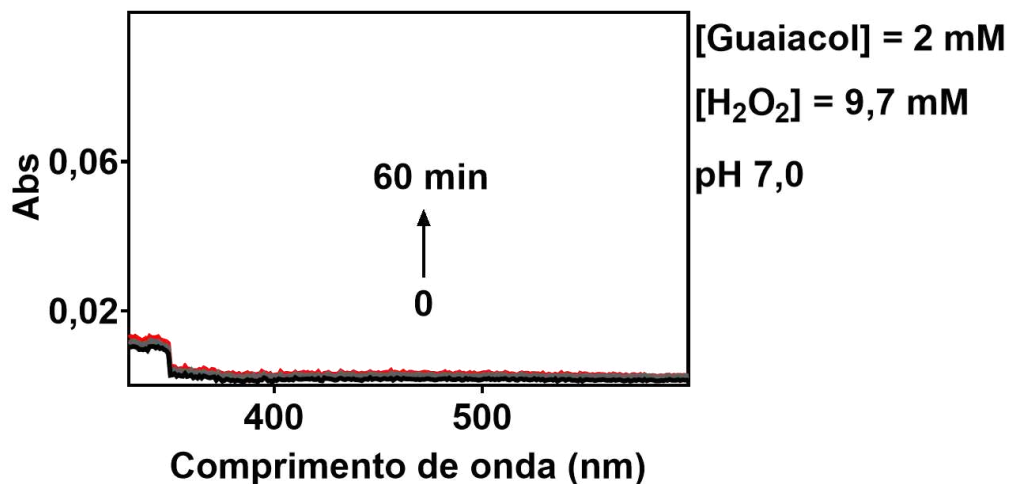
Fonte: o autor.

Figura II – *o*-fenilenodiamina (OPD) incubado com H_2O_2 . Espectros de absorção eletrônica UV-Vis.



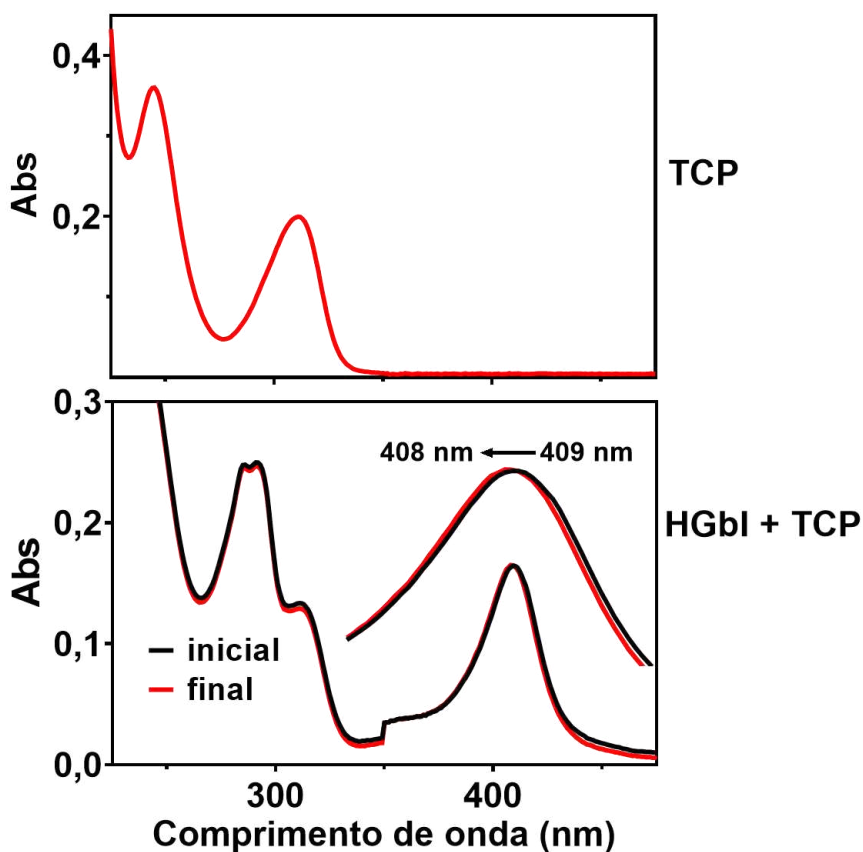
Fonte: o autor.

Figura III – Guaiacol incubado com H₂O₂. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis.



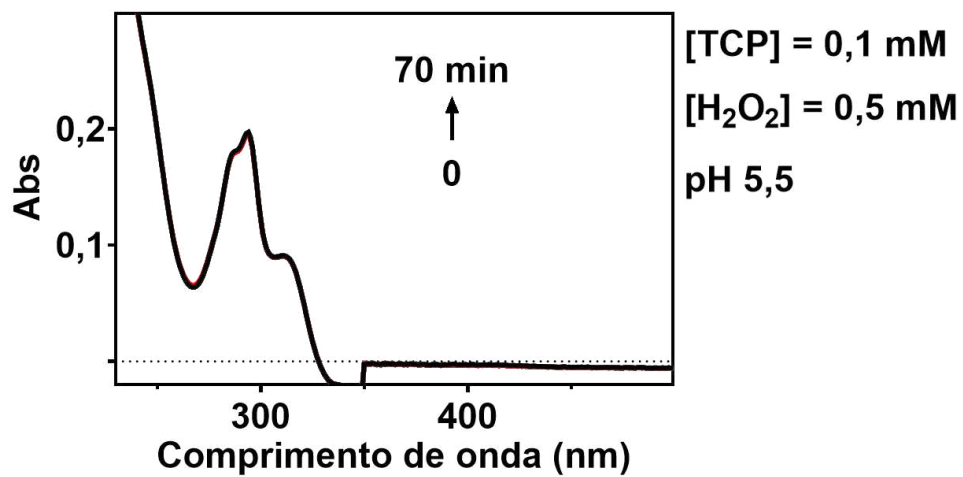
Fonte: o autor.

Figura IV – Espectros de absorção eletrônica UV-Vis do 2,4,6-triclorofenol (TCP) e da HGBI incubada com TCP.



Fonte: o autor.

Figura V – 2,4,6-triclorofenol (TCP) incubado com H_2O_2 . Espectros de absorção eletrônica UV-Vis.



Fonte: o autor.

ANEXO B - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (AUTOR PRINCIPAL OU COLABORADOR)

Journal of Inorganic Biochemistry 172 (2017) 129–137



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio



Insights into signal transduction by a hybrid FixL: Denaturation study of on and off states of a multi-domain oxygen sensor



Wellinson G. Guimarães^a, Ana C.S. Gondim^a, Pedro Mikael da Silva Costa^a,
Marie-Alda Gilles-Gonzalez^b, Luiz G.F. Lopes^a, Marta S.P. Carepo^{a,*}, Eduardo H.S. Sousa^{a,*}

^a Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60455-760 Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75390-9038, United States

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.013>

Received 21 December 2016; Received in revised form 21 March 2017; Accepted 2 April 2017

Available online 13 April 2017

0162-0134/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

The FEBS
Journal

FEBS PRESS
science publishing by scientists



Oxygen triggers signal transduction in the DevS (DosS) sensor of *Mycobacterium tuberculosis* by modulating the quaternary structure

Josiane Bezerra da Silva Lobão¹, Ana C. S. Gondim¹, Wellinson G. Guimarães¹,
Marie-Alda Gilles-Gonzalez², Luiz Gonzaga de França Lopes¹ and Eduardo H. S. Sousa¹



¹ Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara, Center for Sciences, Fortaleza, Brazil

² Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

(Received 7 October 2018, revised 5
November 2018, accepted 14 December
2018)

doi:10.1111/febs.14734

A spectroelectrochemical investigation of the heme-based sensor DevS from *Mycobacterium tuberculosis*: a redox versus oxygen sensor

Giamwemberg A. Barreto¹, Marta S. P. Carepo^{1,2}, Ana C. S. Gondim¹, Wellinson G. Guimarães¹, Luiz G. F. Lopes¹, Paul V. Bernhardt³, Tércio F. Paulo¹, Eduardo H. S. Sousa¹  and Izaura C. N. Diógenes¹ 

¹ Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

² UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

³ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia

(Received 23 April 2019, revised 10 May 2019, accepted 27 June 2019)

doi:10.1111/febs.14974



BioChem



Review

Heme-Based Gas Sensors in Nature and Their Chemical and Biotechnological Applications

Ana Claudia Silva Gondim, Wellinson Gadelha Guimarães and Eduardo Henrique Silva Sousa * 

Bioinorganic Group, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara, Fortaleza 60440-900, Brazil; agondim@dqoi.ufc.br (A.C.S.G.); wellinson000@yahoo.com.br (W.G.G.)

* Correspondence: eduardohss@dqoi.ufc.br

Abstract: Sensing is an essential feature of life, where many systems have been developed. Diatomic molecules such as O₂, NO and CO exhibit an important role in life, which requires specialized sensors. Among the sensors discovered, heme-based gas sensors compose the largest group with at least eight different families. This large variety of proteins also exhibits many distinct ways of sensing diatomic molecules and promote a response for biological adaptation. Here, we briefly describe a story of two impressive systems of heme-based oxygen sensors, FixL from *Rhizobium* and DevS(DosS)/DosT from *Mycobacterium tuberculosis*. Beyond this, we also examined many applications that have emerged. These heme-based gas sensors have been manipulated to function as chemical and biochemical analytical systems to detect small molecules (O₂, CO, NO, CN⁻), fluorophores for imaging and bioanalysis, regulation of processes in synthetic biology and preparation of biocatalysts among others. These exciting features show the robustness of this field and multiple opportunities ahead besides the advances in the fundamental understanding of their molecular functioning.



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc



Redox potential determination of the Hell's Gate globin I protein facing multiple exogenous ligands

Luiz H.C. Souza, Wellinson G. Guimarães, Eduardo H.S. Sousa^{*}, Izaura C.N. Diógenes^{*}

Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108027>

Received 29 May 2022; Received in revised form 24 September 2022; Accepted 26 September 2022

Available online 30 September 2022

0026-265X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001