



**Explorando a Versatilidade Catalítica da 1,2-Dihidroxinaftaleno Dioxigenase (DoxG): Implicações em Processos de Biorremediação**

**Mozart S. Pereira1(PG), Diego M. Martins1(PG), Tiago A. S. Brandão1(PQ)**

1 Departmento de Química/Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 31.270-901

e-mail:mozartsilviop@gmail.com

**RESUMO**

Bactérias do gênero Pseudomonas possuem um notável conjunto de enzimas capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenase (DoxG) de Pseudomonas sp. C18 é uma extradiol dioxigenase pertencente a via de degradação do naftaleno. Esta catalisa a conversão do 1,2-dihidroxinaftaleno (1,2-DHN) em 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato por meio de uma dioxigenação. Caracterizada por um sítio ativo volumoso, é hipotetizado que a DoxG apresenta elevada promiscuidade. Através de estudos cinéticos com catecol, 3-metilcatecol e 2,3-dihidroxibifenil (2,3-DHB) demonstramos que a eficiência catalítica (kcat/Km) da enzima para 2,3-DHB foi cerca de 1000 vezes superior à observada para catecol e 10 vezes maior que o 3-metilcatecol. Esses resultados indicam uma preferência por substratos volumosos e reforçam o potencial da DoxG em aplicações biotecnológicas voltadas à biorremediação de HPAs e bifenilos policlorados.

Palavras-chave: Catálise enzimática, extradiol dioxigenase, 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenase

*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_*

**Introdução**



Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são poluentes orgânicos persistentes com reconhecido potencial tóxico, carcinogênico e mutagênico (1). A presença desses compostos no ambiente aumentou significativamente desde a Revolução Industrial (2). Dentre os microrganismos capazes de degradar HPAs, destaca-se o gênero *Pseudomonas*, que possui um amplo repertório de enzimas adaptadas à utilização desses compostos como fonte de carbono (3). A 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenase de *Pseudomonas sp*. C18 (DoxG), uma extradiol dioxigenase Fe²⁺ dependente, catalisa a clivagem do 1,2-DHN, promovendo a formação de 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato (Figura 1). O objetivo desse trabalho é explorar a atividade da enzima DoxG frente a diferentes possíveis substratos para avaliar sua utilização em métodos quimioenzimáticos de bioremediação.

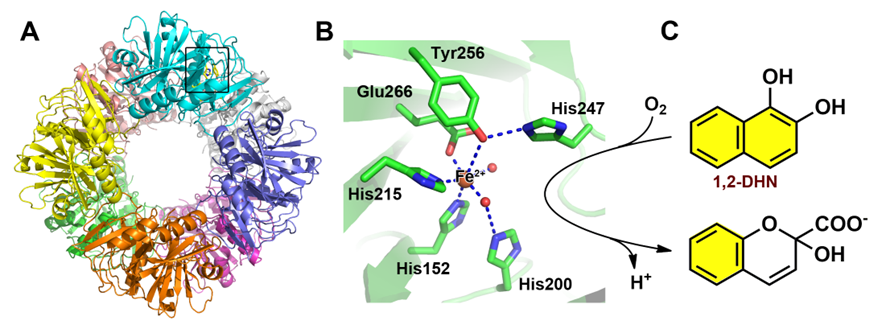


Figura 1: A 1,2-di-hidroxinaftaleno dioxigenase (DoxG): (A) estrutura de raio-X do octâmero; (B) destaque do sítio ativo (PDB ID 2EI1); (C) conversão de 1,2-DHN em 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxilato catalisada por DoxG.

**Experimental**

A DoxG foi expressa em Escherichia coli cultivada em meio mínimo M9, suplementado com ampicilina, sais minerais, Mn²⁺ e Fe²⁺. O crescimento bacteriano foi induzido por IPTG, seguido por incubação a 18 °C. As células foram lisadas por ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido e ultrassonicação. A purificação foi realizada em duas etapas cromatográficas: troca iônica (HiTrap Mono Q) e exclusão molecular (HiLoad Superdex 75), com posterior concentração e armazenamento da enzima purificada. As técnicas de eletroforese SDS-PAGE e espalhamento dinâmico de luz (EDL) foram utilizadas para caracterizar a DoxG obtida (7).

A atividade enzimática foi monitorada por espectroscopia UV-Vis, a 25 ± 0,1 °C, utilizando diferentes substratos: 3-metilcatecol, catecol e 2,3-dihidroxibifenil. As reações foram estudadas em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5 ou 7,0. Para determinar os parâmetros cinéticos (*Km* e *kcat*), foram realizadas curvas de saturação de substrato e os dados foram ajustados com o modelo de Michaelis-Menten.

**Resultados e Discussão**

A caracterização da amostra revelou que a enzima se encontra pura e na forma de octâmero em solução, conforme esperado pela literatura (6). Dioxigenases ferrodependentes tendem a perder sua atividade enzimática ao longo do tempo devido à mudança do estado de oxidação do ion Fe2+ presente no sítio ativo (8).Para contornar essa perda de atividade, foi feito um processo de reativação da enzima.

Para reativação da enzima, diferentes condições foram testadas. A condição ideal consiste na incubação da enzima por mais de 2,5 horas em tampão ácido acético/acetato (50 mM, pH 5,75), contendo 5% v/v de álcool terc-butílico, 0,5 mM de sulfato ferroso e 1 mM de ácido ascórbico. Os resultados revelaram que a condição de reativação estabelecida foi eficaz em restaurar a atividade da DoxG, minimizando os efeitos deletérios da oxidação do Fe²⁺ durante a purificação.

A comparação dos parâmetros cinéticos obtidos para o 2,3-DHB em pH 7,0 com aqueles descritos na literatura, indicou que a enzima apresenta um *kcat* três vezes inferior ao previamente reportado



(Tabela 1), sugerindo uma atividade ligeiramente reduzida nas condições experimentais adotadas (8). Todavia, nos achados da literatura a enzima foi purificada em condições anaeróbicas, enquanto realizamos todos os

estudos em condições aeróbicas.



**Figura 2:** Atividade enzimática para a DoxG em diferentes concentrações de 2,3-dihidroxibifenil em pH 7,0 e 25 ± 0,1 ºC. A curva de ajuste foi plotada considerando-se uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Foram feitos as curvas de maneira análoga para o 2,3-dihidroxibifenil para avdeterminação dos parâmetros cinéticos de difernetes substratos (Tabela 1). Os dados demonstraram uma clara preferência da enzima por substratos volumosos. O valor da constante de especificidade *(kcat/Km*) para o 2,3-DHB foi aproximadamente 10 vezes superior ao observado para o 3-metilcatecol, que por sua vez foi cerca de 100 vezes maior que o valor obtido para o catecol. Tais dados reforçam a hipótese de que o sítio ativo volumoso da DoxG favorece a acomodação e catálise de substratos com mais de um anel

**Tabela 1 - Valores das constantes cinéticas obtidas a partir do ajuste não-linear dos dados cinéticos para a clivagem dos substratos pela DoxG em tampão fosfato 100 mM e 25 ± 0,1 ºC.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Substrato* | *Kmapp (mM)* | *kcatapp (min-1)* | *kcat/Km (M-1 min-1)* |
| 3-metilcatecol(pH 6,5) | 0,09 ± 0,01 | 62 ± 3 | (4,8 ± 0,2) × 105 |
| Catecol (pH 6,5) | 0,9 ± 0,1 | 5,4 ± 0,2 | (6,6 ± 0,2) × 103 |
| 2,3-dihidroxibifenil (pH 6,5) | 0,0046 ± 0,0006 | 65 ± 3 | (7,1 ± 0,9) × 106 |
| 2,3-dihidroxibifenil (pH 7,0) | 0,0044 ± 0,0005 | 36 ± 1 | (4,2 ± 0,4) × 106 |
| 2,3-dihidroxibifenil (pH 7,0)a | 0,0026 | 108 | 4,08 × 106 |

aDados obtidos por Fortin e colaboradores (2005).



**Conclusões**

A DoxG demonstrou elevada especificidade por substratos volumosos, característica atribuída ao seu sítio ativo. Os parâmetros cinéticos determinados neste estudo indicam que a enzima mantém sua capacidade catalítica mesmo após o processo de purificação e reativação. Esses achados reforçam o potencial biotecnológico da DoxG para aplicações em biorremediação de HPAs e BPCs, representando uma ferramenta promissora para o tratamento de ambientes contaminados por compostos aromáticos recalcitrantes.

**Agradecimentos**

CNPq, FAPEMIG

**Referências**

1 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2013). Bitumens and bitumen emmissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 103, 9–303.

2 Cáslavský, J., & Kotlaríková, P. (2005). Analysis of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laser Desorption-Ionisation/Time-of-Flight Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry. In E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, & D. Robert (Eds.), Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems (pp. 393-408). Berlin: Springer.

3 Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS microbiology reviews, 32(6), 927–955. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x

4 Barriault, D., Durand, J., Maaroufi, H., Eltis, L. D., & Sylvestre, M. (1998). Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes. Applied and Environmental Microbiology,64(12),4637–4642.

5 Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., & Young, K. D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. Journal of Bacteriology, 175(21), 6890–6901. https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6890-6901.1993

6 Neau, D. B. (2004). Structural Studies of the 1,2-Dihydroxynaphthalene Dioxygenase, DoxG, Reveal Features that Permit the Cleavage of 4-Substituted Catechols. Ph.D. thesis, Purdue University.

7 Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (2009). Guide to protein purification (2nd ed). Elsevier/Academic Press.

8 Fortin, P. D., MacPherson, I., Neau, D. B., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2005a). Directed evolution of a ring-cleaving dioxygenase for polychlorinated biphenyl degradation. The Journal of biological chemistry,280(51),4230742314.https://doi.org/10.1074/jbc.M510456200