Marcella Oliva Paganelli

Expressão, Purificação e Estudos da Ferroquelatase de *Bacillus subtilis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Aos meus pais, Vera e Henrique, por todo amor, dedicação, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao Prof. Dr. Daniel R. Cardoso pela orientação, pela amizade e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Júlio C. Borges, pelos ensinamentos, pela amizade e por me acolher em seu laboratório por esse período.

Aos meus pais Vera e Henrique pelo amor, pela dedicação e pelo apoio em todos esses anos de estudo.

Aos meus irmãos Luiza e Pedro pelo companheirismo, pelo amor e por toda a ajuda com as minhas dificuldades tecnológicas.

Ao meu namorado Victor por estar sempre ao meu lado, pelo amor, pela paciência e por toda ajuda para finalizar a dissertação.

Aos meus amigos pessoais e partes integrantes da família Aline e Gustavo por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos do LBBP Ju, Paulo, Thiago, Glessler, Fer, Karine, Lisandra, Carol e Vanda por me acolherem, pela agradável convivência e pelas risadas e piadas nerds. Gostaria de agradecer especialmente a Vanda por toda ajuda nos experimentos realizados.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica e Inorgânica, pelo auxílio nos experimentos, em especial a Silvinha.

Ao Dr. Alberto Grossi pela parceria na realização dos experimentos.

Aos amigos da turma 007 do IQSC pela amizade durante e depois dos anos de graduação.

Aos amigos da UCBVET pela força e incentivo.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

RESUMO

A cor vermelha brilhante característica do presunto Parma é resultante, principalmente, do pigmento Zinco-protoporfirina IX (ZnPP). A ZnPP é formada a partir da mioglobina por uma reação de transmetalção, catalisada pela enzima ferroquelatase (FECH), em que o íon de Fe(II) coordenado ao grupo heme é substituído pelo íon Zn(II). O presunto Parma apresenta uma maior estabilidade oxidativa em relação aos demais produtos cárneos curados além de não conter nitrito e nitrato, portanto, são considerados mais saudáveis. A utilização da FECH no processamento de carnes curadas pode permitir a produção de produtos cárneos curados mais saudáveis e em menor tempo. No presente trabalho a proteína ferroquelatase de *Bacillus subtilis* (BsFECH) foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3), purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e exclusão por tamanho e caracterizada por dicróismo circular, emissão de fluorescência do triptofano e cromatografia de exclusão por tamanho analítico. Em termos de estabilidade foi encontrado que altas concentrações de sal aumentam a estabilidade da proteína frente aos agentes denaturantes ureia e temperatura. A BsFECH produzida é capaz de ligar-se ao substrato modelo de porfirina (TPPS), conforme verificado por espectroscopia de UV-Vis, com uma $K_a = 3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e é capaz de se associar à metamioglobina, conforme verificado por reação de cross-linking com dissuccinimidil suberato e avaliado por SDS-PAGE. A BsFECH aumenta significativamente a taxa de inserção de íons de zinco na TPPS e mostra uma cinética de saturação com uma constante de ligação aparente de Zn(II) ao complexo [BsFECH-TPPS] de $1,3 \times 10^4 \text{ M}$ e uma constante de primeira ordem de $6,6 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ para a dissociação do complexo ternário. A reação de troca ferro/zinco na mioglobina catalisada pela BsFECH é facilitada pela proteólise limitada da mioglobina com pepsina que abre um caminho para a reação de troca metálica com base na interação proteína-proteína entre o fragmento globina da mioglobina e a BsFECH.

ABSTRACT

The bright red color, characteristic of the Parma ham, results mainly of the pigment Zinc-Protoporphyrin IX (ZnPP). The ZnPP is formed from myoglobin by the reaction, catalyzed by ferrochelatase enzyme (FECH), in which Fe(II) ions coordinated to the heme group is replaced by Zn(II) ions. Parma ham shows greater oxidative stability when compared to others cured meat products besides do not contain nitrite and nitrate and, therefore, is considered healthier. The use of FECH in the processing of cured meats may allow the production of healthier cured meat products in a shorter period of time. In this work, the ferrochelatase protein from *Bacillus subtilis* was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells, purified by nickel affinity chromatography and size exclusion, and characterized by circular dichroism, fluorescence emission of tryptophan and analytical size exclusion chromatography. In terms of stability, it was found that the high salt content enhances the protein stability against the denaturation agents urea and temperature. The BsFECH produced is able to bind to the porphyrin model substrate (TPPS), as verified by UV-Vis spectroscopy, with $K_a = 3.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and is capable to associate to metamyoglobin as verified by cross-linking reaction with disuccinimidil suberate, as observed by SDS-PAGE. The BsFECH increases, significantly, the zinc ions insertion rate in TPPS and shows a saturation kinetics behavior with an apparent binding constant of Zn(II) to the [BsFECH-TPPS] complex of $1.3 \times 10^4 \text{ M}$ and a first order rate constant for the dissociation of ternary complex of $6.6 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$. The Fe/Zn exchange reaction in the myoglobin as catalyzed by BsFECH is facilitated by myoglobin-limited proteolysis with pepsin that opens a reaction channel for the metallic exchange based on protein-protein interaction between the globin moiety of myoglobin and BsFECH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da metamioglobina do coração de cavalo, em destaque a ferro porfirina.	16
Figura 2 - Estrutura química da protoporfirina IX, constituinte do grupo prostético da mioglobina.	17
Figura 3 - Interconversão entre os pigmentos da carne fresca.....	18
Figura 4 - Formação da MbFe(III) a partir da oxidação da MbFe(II) e MbFe(II)O ₂ mediante ação do nitrito como oxidante.	19
Figura 5 - Mecanismo proposto para a formação da espécie MbFe(II)NO em carne curada.	20
Figura 6 - Estrutura química da zinco-protoporfirina IX (ZnPP).	21
Figura 7 - Mecanismo proposto para a formação da ZnPP durante a maturação do presunto Parma.	23
Figura 8 - Reação terminal da rota biosintética do grupo heme catalisada pela enzima ferroquelatase.	24
Figura 9 - Representação esquemática da estrutura da FECH de <i>Bacillus subtilis</i> (BSFECH)..	26
Figura 10 - SDS-PAGE 12% mostrando as etapas de produção e purificação da BsFECH.	41
Figura 11 - Espectros de CD da BsFECH em diferentes tampões.	42
Figura 12 - Espectros de emissão de fluorescência da BsFECH na forma nativa e desenovelada (6 M de GndHCl).	43
Figura 13 – Resultados obtidos a partir da cromatografia de exclusão por tamanho analítica.....	44
Figura 14 - Perfis de estabilidade química determinados por CD e fluorescência....	46
Figura 15 - Perfis de estabilidade térmica determinados por CD.	48
Figura 16 - Espectros de absorção para a titulação da TPPS na BSFECH.	49
Figura 17 – Cálculo da constante de afinidade entre a TPPS e a BsFECH em solução aquosa no pH 5,7 a 30 °C.	50
Figura 18 – Espectros de absorção para a reação não catalisada e catalisada de inserção de íons zinco (100 µM) na TPPS (1 µM).....	52
Figura 19 – Gráfico da intensidade de absorbância (em λ = 421 nm) versus tempo de reação (em horas) para as diferentes concentrações de acetato de zinco.	53
Figura 20 – Gráfico de k _{obs} versus concentração de acetato de zinco..	54
Figura 21 - SDS-Page 12% mostrando o experimento <i>de cross-linking</i> com DSS...56	
Figura 22 – Reação de transmetalção da Mb catalisada pela BsFECH recombinante.	57
Figura 23 – Gel SDS-PAGE 15% mostrando a proteólise da mioglobina com pepsina em função do tempo de incubação. de proteólise.	57
Figura 24 – Intensidade de fluorescência em 590 nm para as reações de transmetalção na presença de 100 µM de acetato de zinco..	58

Figura 25 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos para diferentes espécies de mioglobina.....	59
Figura 26 – Predição da estrutura primária dos polipeptídios obtidos pela digestão da mioglobina utilizando-se o programa <i>Peptide Cutter</i> (http://web.expasy.org/peptide_cutter).....	61
Figura 27 – Estrutura tridimensional da mioglobina, digerida por 5 minutos com pepsina, obtida a partir da modelagem por homologia utilizando-se o software <i>Phyre²</i> (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções tampão utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos.	29
Tabela 2 - Estimativa da estrutura secundária da BsFECH recombinante em diferentes tampões a partir do programa <i>CDNN Deconvolution</i> .	42
Tabela 3 - Sumário dos resultados obtidos na cromatografia de exclusão por tamanho analítica.	45
Tabela 4 - Valores de C_m calculados a partir do ajuste sigmoidal Dose-Response dos perfis de estabilidade térmica determinados por CD e Fluorescência apresentados na Figura 14.	46
Tabela 5 - Valores de T_m calculados a partir do ajuste sigmoidal Dose-Response dos perfis de estabilidade térmica determinados por CD apresentados na figura 15.	48
Tabela 6 – Valores de k_{obs} obtidos, a partir do ajuste não linear das curvas mostradas na Figura 20, para cada concentração de acetato de zinco.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BsFECH	ferroquelatase de <i>Bacillus subtilis</i>
CD	dicroísmo circular
C _m	concentração de ureia em que 50% das espécies em solução estão enoveladas e 50% desenoveladas
DSS	dissuccinimidil suberato
GndHCl	cloridrato de guanidina
FECH	ferroquelatase
Mb	mioglobina
MbFe(II)	deoximioglobina
MbFe(II)NO	nitrosilmioglobina
MbFe(II)O ₂	oximioglobina
MbFe(III)	metamioglobina
MbFe(III)NO	nitrosilmetamioglobina
MM	massa molecular
MMap	massa molecular aparente
PPIX	protoporfirina IX
R _s	raio de Stokes experimental
R _o	raio de Stokes teórico
T _m	temperatura em que 50% das espécies em solução estão enoveladas e 50% desenoveladas
TPPS	4,4',4'',4'''-(Porfirina-5,10,15,20-tetrail)tetrakis(ácido benzenesulfônico)
ZnPP	zinco-protoporfirina IX

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Carne seca curada (<i>Jerked beef</i>)	14
1.1.2 Coloração das carnes curadas	15
1.2 Presunto Parma	21
1.3 Ferroquelatase	24
2 OBJETIVOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Soluções tampão e soluções desnaturantes	29
3.2 Produção e purificação da ferroquelatase de <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.2.1 Expressão da proteína ferroquelatase de <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.2.2 Purificação da ferroquelatase de <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.2.3 Determinação da concentração da proteína	31
3.3 Caracterização Biofísica.....	31
3.3.1 Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i> – CD).....	32
3.3.2 Fluorescência intrínseca do triptofano	32
3.3.3 Cromatografia de exclusão molecular analítica	33
3.4 Estudos de estabilidade	34
3.4.1 Desenovelamento químico.....	34
3.4.2 Desenovelamento térmico.....	35
3.5 Estudos funcionais.....	35
3.5.1. Interação entre TPPS e BsFECH	35
3.5.2 Reação de inserção de íons zinco na TPPS.....	37
3.5.3 Reação de inserção de íons zinco na Mb.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Produção e purificação da BsFECH	41
4.2 Caracterização biofísica	41
4.2.1 Estrutura secundária	41

4.2.2 Estrutura terciária	43
4.2.3 Caracterização hidrodinâmica	44
4.3 Estudos de estabilidade	45
4.3.1 Estabilidade química	45
4.3.2 Estabilidade térmica	47
4.4. Estudos funcionais	49
4.1.1 Interação entre a TPPS e BsFECH	49
4.1.2 Reação de inserção de íons Zinco na TPPS	51
4.1.3 Interação entre BsFECH e Mb	55
5 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carne seca curada (*Jerked beef*)

O processo de cura de carnes, uma das formas mais antigas de conservação desses alimentos, teve origem nos tempos pré-históricos com o objetivo de armazenar e conservar os produtos cárneos para consumo em períodos posteriores.¹ O termo carne curada refere-se ao processo universalmente conhecido do tratamento de carnes com sal, nitritos ou nitratos entre outros ingredientes que objetivam desenvolver cor, sabor e aromas específicos, além de preservar o produto. Enquanto vários ingredientes, incluindo açúcar, especiarias, entre outros, são normalmente adicionados durante o processamento, é a adição do nitrito/nitrato que resulta na característica da carne curada.^{2,3}

A carne seca é um produto curado tipicamente brasileiro produzido a partir da denominada tecnologia de obstáculos (*Hurdle Technology*), em que alguns obstáculos são aplicados juntamente para inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, aumentar a estabilidade, melhorar a qualidade sensorial e as propriedades nutricionais dos alimentos. Esses obstáculos aplicados isoladamente não são capazes de produzir o mesmo efeito que quando aplicados simultaneamente.^{2,4} No processamento usual da carne seca os obstáculos aplicados são adição de cloreto de sódio, nitrito de sódio, desidratação e embalagem a vácuo.

O cloreto de sódio (NaCl) é o sal mais utilizado nas misturas de cura. Dentre suas funções destaca-se a extração e a solubilização das proteínas miofibrilares (que facilita a emulsificação das gorduras contribuindo para a melhoria da textura do produto) e a inibição do crescimento de alguns microrganismos (o NaCl aumenta a pressão osmótica do meio e, consequentemente, reduz a atividade de água). Entretanto, em associação com o calor, o NaCl atua como pró-oxidante dos lipídeos, favorecendo a oxidação lipídica e promovendo a evolução do aroma de ranço.⁵ A ingestão de produtos tóxicos oriundos da oxidação lipídica, entre eles o malonaldeído e os óxidos de colesterol, desperta a atenção dos consumidores devido à possível relação desses com o aumento da incidência de câncer, doenças cardíacas e envelhecimento precoce. Além disso, o alto teor de sódio em produtos curados também vem sendo relacionado ao aumento da hipertensão e do risco de doenças cardiovasculares.^{6,7}

Embora o NaCl seja um ingrediente essencial, os nitritos/nitratos são ingredientes indispensáveis na produção de carnes curadas, esses são adicionados durante o processo de cura, principalmente, na forma de nitrito e nitrato de sódio. Dentre as principais funções desses destaca-se a indução e estabilização da coloração rósea avermelhada característica dos produtos curados, a contribuição no aroma e sabor, o retardamento da rancidez oxidativa e a inibição do crescimento de microrganismos de uma maneira geral, e, em especial da bactéria patogênica formadora de esporo *Clostridium botulinum*.⁸ Apesar das vantagens sensoriais e microbiológicas obtidas pela adição de nitritos/nitratos a utilização destes causa questionamentos, uma vez que sob determinadas condições, o nitrito pode reagir com as aminas e aminoácidos presentes na carne formando N-nitrosaminas, que são agentes químicos com reconhecida propriedade carcinogênica.⁹

1.1.2 Coloração das carnes curadas

Dentre os vários parâmetros atribuídos à qualidade da carne, a coloração é o que mais influência nas decisões de compra. A coloração das carnes é determinada por uma série de fatores, sendo o mais importante a forma química e a concentração das hemoproteínas, em especial, da mioglobina (Mb).¹⁰ Nos músculos vivos a Mb atua armazenando e transportando localmente oxigênio nos tecidos, já nas carnes, atua como principal pigmento responsável pela coloração vermelha. Outros pigmentos, como hemoglobina e citocromo-C também contribuem para a coloração das carnes, no entanto, em menor grau.¹¹

A Mb é uma proteína globular monomérica de massa molecular 16,9 kDa constituída por uma cadeia polipeptídica contendo 153 resíduos de aminoácidos, denominada globina, e o grupo prostético heme. A estrutura secundária da proteína é constituída principalmente por α -hélices, sendo composta por oito seções de hélices variando de 3 a 23 resíduos que são nomeadas de A a H.¹² A Figura 1 ilustra a estrutura tridimensional da Mb incluindo o grupo prostético heme.

Figura 1 - Estrutura tridimensional da metamioglobina do coração de cavalo, em destaque a ferro porfirina.

Fonte: LIBARDI, S. H. Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato intestinal. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.¹³

O grupo prostético heme é um composto organometálico constituído por uma estrutura orgânica cíclica, a protoporfirina IX (PPIX), composta por quatro anéis pirrólicos unidos (anel tetrapirrólico) que estão coordenados a um íon ferro.⁹ Esse íon possui seis sítios para ligação por coordenação, sendo que quatro deles estão ocupados por átomos de nitrogênio do anel tetrapirrólico, o quinto está ligado a um resíduo de histidina (His proximal) da globina e o sexto está disponível para ligações com o oxigênio ou outras moléculas pequenas, tais como o monóxido de carbono (CO) ou o óxido nítrico (NO).¹⁴ O ligante presente no sexto sítio de coordenação e a valência do ferro heme influenciam diretamente na coloração das carnes. O ferro heme pode existir no estado ferroso (+2) ou no estado férrico (+3), dependendo da presença de redutores e oxidantes no meio.⁹ A Figura 2 mostra a estrutura química da PPIX.

Figura 2 - Estrutura química da protoporfirina IX, constituinte do grupo prostético da mioglobina.

Fonte: MØLLER, J. K. S. Myoglobins & Nitric Oxide. 2002. 105 f. Tese (Pós-Doutorado) –Departament of Dairy and Food Science - Section for Food Chemistry – The Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca, 2002. ¹²

Na carne fresca a mioglobina pode ser encontrada em três diferentes formas químicas: deoximioglobina (MbFe(II)), oximioglobina (MbFe(II)O_2) e metamioglobina (MbFe(III)). A MbFe(II) ocorre quando não há ligante no sexto sítio de coordenação e o ferro heme está no estado ferroso (+2), resultando em uma coloração vermelho púrpura, tipicamente associada a produtos embalados a vácuo ou ao músculo imediatamente após o corte. Quando a Mb é exposta ao oxigênio ocorre a oxigenação desta e a formação da MbFe(II)O_2 , que é caracterizada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelho brilhante proporcionando um aspecto atraente para o consumidor. Nesse caso, o sexto sítio de coordenação está ocupado por uma molécula de oxigênio diatômica e não há mudança no estado de oxidação do íon complexo de ferro. Tanto a MbFe(II) quanto a MbFe(II)O_2 podem sofrer oxidação formando a MbFe(III) e dando origem à coloração marrom indesejada. Na MbFe(III) o íon complexo de ferro encontra-se no estado férrico (+3) e o sexto sítio de coordenação é ocupado por uma molécula de H_2O .^{9,12,15} Na carne crua existe um ciclo dinâmico de tal modo que, na presença de oxigênio, esses três pigmentos podem ser interconvertidos, conforme ilustrado na Figura 3.⁹

Figura 3 - Interconversão entre os pigmentos da carne fresca.

Fonte: PEGG, R. B.; SHAHIDI, F. Unraveling the chemical identity of meat pigments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n. 6, p. 567-589, 1997. ⁹

Nos produtos cárneos curados fabricados a partir da adição de nitritos ou nitratos o pigmento responsável pela coloração vermelho-rosada é a nitrosilmioglobina (MbFe(II)NO). A MbFe(II)NO é originada da reação entre a Mb e os íons nitrito/nitrato.¹⁶ Quando o nitrito é adicionado à carne ele atua primeiramente como um oxidante, oxidando a espécie MbFe(II)O₂ (e/ou a MbFe(II)) e originando a espécie MbFe(III), proporcionando assim uma mudança da coloração vermelha brilhante para

a coloração marrom.¹⁷ As reações de formação de MbFe(III) a partir da oxidação da MbFe(II) e MbFe(II)O₂ são ilustradas na Figura 4.

Figura 4 - Formação da MbFe(III) a partir da oxidação da MbFe(II) e MbFe(II)O₂ mediante ação do nitrito como oxidante.

Fonte: MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Color, in Handbook of fermented meat and poultry. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2008, cap.23, p. 203-216. ¹⁶

Posteriormente, a espécie MbFe(III) reage com o óxido nítrico originando a nitrosilmetamioglobina (MbFe(III)NO). A MbFe(III)NO é instável e sofre redução com o tempo e na presença de agentes redutores endógenos, como o NADH, ou exógenos, como o ascorbato ou eritorbato, originando sua forma relativamente estável, a espécie MbFe(II)NO.⁹ Killday et al. propuseram um mecanismo alternativo em que a MbFe(III)NO sofre uma auto-redução levando a formação de um radical imidazol da proteína, que pode ser reduzido a partir da doação de um elétron de grupos ricos em elétrons pertencentes à proteína, conforme mostrado na Figura 5.^{17,18}

Figura 5 - Mecanismo proposto para a formação da espécie MbFe(II)NO em carne curada.

Fonte: MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Nitric Oxide and Myoglobins. **Chemical Reviews**, v.102, p.1167-1178, 2002. ¹⁹

Após o processamento térmico a globina é desnaturada, desprende-se do átomo de ferro e rodeia a porção heme, formando-se assim o pigmento nitrosilhemocromo, que confere à carne curada cozida a coloração rosa característica.⁹

1.2 Presunto Parma

O presunto seco curado originado no norte da Itália, conhecido como presunto Parma, pode ser diferenciado dos tradicionais produtos cárneos curados no que diz respeito às qualidades sensoriais como sabor, textura e cor.²⁰ O presunto Parma é produzido a partir de patas de suínos salgadas com sal marinho, proveniente do mediterrâneo, secas e maturadas pelo período mínimo de um ano.²¹ Os nitritos e nitratos foram banidos do processamento desses presuntos desde 1993, e apesar da ausência desses agentes de cura, observa-se nesses produtos o desenvolvimento de uma coloração vermelha brilhante característica com alta estabilidade.^{16,22}

O principal pigmento responsável pela coloração característica do presunto Parma permaneceu desconhecido até 2004, quando foi identificado por um grupo de pesquisa japonês como o pigmento zinco-protoporfirina IX (ZnPP).²¹ Posteriormente, também foi identificada a presença desse pigmento em outros produtos cárneos curados produzidos sem a adição de nitritos ou nitratos, como por exemplo, no presunto Ibérico.²⁴ A estrutura química da ZnPP está apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura química da zinco-protoporfirina IX (ZnPP).

Fonte: WAKAMATSU, J.; ITO, T.; NISHIMURA, T.; HATTORI, A. Direct demonstration of the presence of zinc in the acetone-extractable red pigment from Parma ham. **Meat Science**, v.76, p.385–387, 2007.²³

Foi evidenciado que a ZnPP é formada gradualmente durante todo o período de processamento do presunto, sendo que seu conteúdo aumenta expressivamente durante a maturação.²² Acredita-se que a ZnPP é formada a partir da Mb por um processo de transmetalção em que os íons de Fe(II) do grupo heme são substituídos pelos íons de Zn(II), presentes na matriz cárnea, durante o processo de maturação. Foram propostos três possíveis mecanismos para a reação de transmetalção: i) reação não enzimática, sob condições anaeróbicas, em que os íons Zn(II) substituem os íons Fe(II) com concomitante dissociação da porção heme da proteína heme nativa; ii) reação enzimática em que a enzima endógena ferroquelatase catalisa a troca entre os dois metais; iii) reações bacterianas enzimáticas em quem bactérias endógenas degradam as proteínas da carne, incluindo os pigmentos do grupo heme levando à troca entre os metais.²¹

Durante o processo de maturação as proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas sofrem proteólise extensiva resultando na formação de pequenos peptídeos e aminoácidos livres que afetam o desenvolvimento da textura, do sabor e do aroma. Dentre essas proteínas está a Mb, que sofre alterações na sua estrutura proteica, possivelmente, facilitando substituição do ferro por zinco.²² Estudos recentes apontaram que a ZnPP pode ser formada numa reação de metalção não enzimática, paralela à reação catalisada pela FECH.²⁵ No mecanismo proposto, apresentado na figura 7, inicialmente a MbFe(II) sofre proteólise originando a espécie MbFe(II) parcialmente degradada, que é mais propícia ao ataque da FECH para a remoção dos íons Fe(II) originando a espécie protoporfirina IX/globina degradada em que são inseridos espontaneamente os íons Zn(II) originando a ZnPP. Os íons Fe(II) gerados são oxidados a Fe(III) que sob condições neutras e na presença de aminoácidos e outros quelantes como fosfato são precipitados na matriz cárnea como espécies de Fe(III) coloidal, essa etapa é essencial para a formação da ZnPP uma vez que permite o esgotamento dos íons Fe(II) solúveis, impedindo que esses se liguem novamente ao anel vazio da porfirina.²⁵

Figura 7 - Mecanismo proposto para a formação da ZnPP durante a maturação do presunto Parma.

Fonte: GROSSI, A. B.; NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; SKIBSTED, L. H. Proteolysis involvement in zinc–protoporphyrin IX formation during Parma ham maturation. **Food Research International**, v.56, p.252-259, 2014. ²⁵

Dentre os mecanismos propostos acredita-se que a transmetalção catalisada pela FECH é o caminho principal para a formação da ZnPP durante o período de salga da carne, enquanto que o processo não enzimático torna-se importante em períodos mais longos, durante a maturação, após a inativação da enzima.¹⁰

A formação da ZnPP é dependente de diversos fatores como temperatura, concentração de sal e presença de nitritos e nitratos. Foi evidenciado que o aumento de temperatura diminui a formação da ZnPP (temperaturas acima de 60°C) enquanto que temperaturas mais baixas (temperatura ambiente) são favoráveis à sua formação. Baixas concentrações de NaCl (3%) favorecem a formação do pigmento, provavelmente devido ao efeito *salting-in* que aumenta a solubilidade das proteínas facilitando a reação entre as heme proteínas e o íon de zinco, enquanto que altas concentrações de NaCl inibem a formação, provavelmente devido ao efeito *salting-out* que diminui a atividade de água causada pela hidratação dos íons ou então decorrente da inibição enzimática. Sabe-se que a formação da ZnPP é completamente inibida pela presença de NO. Acredita-se que dois possíveis mecanismos estejam envolvidos nessa inibição: i) o NO reage com a Mb formando a espécie estável MbFe(II)NO que bloqueia a reação de transmetalção, ou ii) o NO inativa a FECH, pela destruição do cluster [2Fe-2S], dificultando a inserção dos íons de Zn^{2+} no grupo heme da mioglobina.¹⁰

1.3 Ferroquelatase

A reação de metalação de porfirinas, que consiste na inserção de íons metálicos nos anéis tetrapirrólicos destas, é um processo que ocorre não enzimaticamente em solventes orgânicos sob condições básicas.²⁶ Nos organismos vivos a reação de metalação é catalisada por uma classe de enzimas denominadas quelatases e resulta em moléculas biologicamente importantes como, por exemplo, o grupo heme (ligação com íons ferro), a clorofila (ligação com íons magnésio) e a vitamina B12 (ligação com íons cobalto).²⁷

Dentro da classe das quelatases a FECH é a enzima mais estudada, esta catalisa a reação terminal da rota biossintética do grupo heme, em que o íon ferroso (Fe(II)) é inserido na PPIX, com a expulsão de dois prótons do anel tetrapirrólico, conforme ilustra a Figura 8.²⁶

Figura 8 - Reação terminal da rota biossintética do grupo heme catalisada pela enzima ferroquelatase.

Fonte: HANSSON, M. D.; LINDSTAM, M.; Crosstalk between metal ions in *Bacillus subtilis* ferrochelatase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, p. 325–333, 2006.²⁸

Os passos que envolvem a reação de metalação, independente desta ocorrer enzimaticamente ou não, são basicamente: aproximação entre o íon metálico e a porfirina; dessolvatação do íon metálico; distorção de um ou mais anéis pirrólicos da porfirina para fora do plano macrocíclico tetrapirrólico em direção ao íon metálico; formação das ligações entre o metal e os dois átomos de nitrogênio não protonados dos anéis pirrólicos; e remoção e expulsão dos dois prótons ligados aos átomos de nitrogênio protonados do anel pirrólico.²⁶ Acredita-se que o papel da FECH nesse mecanismo catalítico seja promover a distorção do anel da porfirina, facilitando assim

a exposição do par de elétrons isolado dos nitrogênios não protonados no anel, facilitando a ligação do metal.²⁹

As FECHs entre todos os organismos são altamente conservadas em relação à estrutura terciária, no entanto, no que diz respeito à estrutura primária o nível de conservação é baixo.³⁰ A identidade da sequência global entre elas é de aproximadamente 12%, sendo que do total de aminoácidos apenas cerca de 20 resíduos são invariáveis.³¹

Algumas diferenças significativas são observadas entre as FECHs de eucariotos e procariotos. Nos eucariotos, a FECH é uma proteína associada à membrana mitocondrial interna com seu sítio ativo voltado para o espaço da matriz mitocondrial, já nos organismos procariotos, a enzima pode estar associada à membrana citoplasmática em algumas espécies enquanto que em outras é citosolúvel, como no caso da FECH de *Bacillus subtilis*.²⁹ As proteínas eucarióticas possuem uma extensão adicional na extremidade N-terminal de 30 a 80 resíduos de aminoácidos em que está contida a sequência que codifica o sinal de direcionamento para a mitocôndria ou cloroplastos, essa região é ausente nas proteínas procarióticas, logo o direcionamento não ocorre.^{29,32} Além disso, os organismos eucarióticos possuem uma extensão C-terminal de 30 a 50 resíduos de aminoácidos, também ausente nos procariotos, a função dessa extensão é desconhecida mas estudos apontaram que a remoção desta resulta na diminuição da atividade enzimática.^{32,33} Outra diferença apontada é a presença de pelo menos um cluster ferro-enxofre ([2Fe-2S]) nos organismos eucariotos, sensível a reação de nitrosação, coordenados pelos resíduos de cisteínas na extremidade C-terminal, que não está presente nos procariotos.³¹ A função desse cluster não foi totalmente elucidada, acredita-se que ele pode estar envolvido na atividade enzimática ou pode atuar na dimerização das enzimas.^{33,34} Estudos apontam que vários produtos químicos são capazes de destruir esse cluster, entre eles estão o oxigênio e o óxido nítrico.³⁵

A FECH de *Bacillus subtilis* (BsFECH) foi a primeira estrutura tridimensional determinada para a família das ferroquelatases. Essa é constituída por 310 resíduos de aminoácidos, possui massa molecular de aproximadamente 35 kDa, é solúvel em água e apresenta-se na forma de um monômero alongado com dimensões aproximadas de 60 x 39 x 43 Å.^{31,32} A proteína é formada por 51% de α -hélices e 20% de folhas β que estão divididas em dois domínios semelhantes, cada um com

enovelamento similar formado por quatro folhas β paralelas flanqueadas por α -hélices.³¹ O domínio I contém os resíduos de 1 a 167 e o domínio II os de 175 a 310, esses domínios estão conectados por um motivo volta-hélice (resíduos 168 e 169 e 170 a 174).³¹ Os dois domínios contribuem para a formação de uma fenda voltada para a superfície da molécula, os resíduos conservados entre as FECHs (Gln221, Ser222, Trp230 e Leu231), que são importantes para a função da enzima, estão localizados dentro dessa fenda ou próximos dela, na superfície da proteína, sugerindo assim que essa fenda é o possível sítio de ligação da porfirina.³¹ A Figura 9 mostra a estrutura tridimensional da FECH de *Bacillus subtilis*.

Figura 9 - Representação esquemática da estrutura da FECH de *Bacillus subtilis* (BSFECH). O domínio 1 é representado pela coloração verde e o domínio 2 pela coloração azul. A região vermelha representa a fenda formada entre os dois domínios e a região amarela promove a ligação entre os domínios.

Fonte: AL-KARADAGHI, S.; HANSSON, M.; NIKONOV, S.; JÖNSSON, B.; HEDERSTEDT, L. Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis. **Structure**, v. 5, n. 11, p. 1501–1510, 1997. ³¹

Foi constatado que a FECH pode catalisar, *in vivo* e *in vitro*, a reação reversa, ou seja, a remoção do íon Fe(II) do grupo heme, em condições redutoras, formando a PPIX.³⁵ Além disso, *in vitro*, a FECH pode catalisar também a formação de metaloporfirinas correspondentes, uma vez que outros íons metálicos divalentes como Co(II), Zn(II), Ni(II) e Cu(II) também podem ser utilizados como substratos.³² Em contrapartida, alguns metais divalentes são inibidores da atividade enzimática tais como íons de Cd(II), Pb(II), Hg(II) e Mn(II).³²

A reação convencional catalisada pela FECH, isto é, a inserção de íons de Fe(II) na PPIX, apresenta um pH ótimo em 7,8 - 8,0, já a reação de remoção do ferro requer um pH ótimo ao redor de 5,7. Considerando o pH das carnes cruas, entre 5,6 e 6,0, e que a concentração de íons Zn(II) nas células musculares é quatro vezes maior que a de Fe(II) a remoção do ferro a partir da Mb e a inserção de zinco pode ocorrer durante o processamento dos presuntos crus curados.³⁶ Sendo assim, a FECH está relacionada tanto com a formação do grupo heme quanto com a formação da ZnPP. Estudos afirmam que o modo que o metal se liga à FECH é complexo e pode envolver dois sítios de ligação.²⁷ O primeiro envolve os resíduos conservados His183 e Glu284, que estão localizados na fenda de ligação da porfirina, e o segundo envolve os resíduos não conservados His88 e Lys87 (numeração para a FECH de *Bacillus subtilis*), localizados do lado oposto da ligação da porfirina.³⁷

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos expressar, purificar e caracterizar a ferroquelatase de *Bacillus subtilis*, verificar a estabilidade e atividade da enzima produzida e investigar o mecanismo proposto para a reação de transmetalção que envolve a proteólise da mioglobina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções tampão e soluções desnaturantes

A Tabela 1 apresenta todas as soluções tampão utilizadas durante os procedimentos experimentais:

Tabela 1 - Soluções tampão utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos.

Solução	Componentes da solução
A	25 mM Fosfato de sódio (pH 7,4), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
B	25 mM Fosfato de sódio (pH 7,4), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol
C	25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM de NaCl, 1 mM de β -mercaptoetanol
D	100 mM Fosfato de sódio (pH 5,7), 200 mM NaCl
E	100 mM Fosfato de sódio (pH 7,4), 200 mM NaCl
F	50 mM Acetato de sódio (pH 5,5), 500 mM NaCl
G	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl
H	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl
I	100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
J	25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM de NaCl
K	100 mM Fosfato de sódio (pH 5,7)
L	100 mM Fosfato de sódio (pH 5,7), 500 mM NaCl
M	100 mM Fosfato de sódio (pH 7,4)
N	100 mM Fosfato de sódio (pH 7,4), 500 mM NaCl

As soluções desnaturantes de ureia e cloridrato de guanidina (GndHCl) utilizadas durante os experimentos foram preparadas de acordo com o método descrito por Pace et al.³⁸ As concentrações das soluções foram determinadas por refratometria utilizando-se as equações 1 e 2:

$$M_{\text{GndHCl}} = 57,15(\Delta N) + 38,68(\Delta N)^2 - 91,60(\Delta N)^3 \quad (\text{equação 1})$$

$$M_{\text{ureia}} = 117,66(\Delta N) + 29,75(\Delta N)^2 + 185,65(\Delta N)^3 \quad (\text{equação 2})$$

em que, M_{GndHCl} e M_{ureia} são as concentrações molares de GndHCl e de ureia e ΔN a diferença entre o índice de refração da solução desnaturante e do tampão (branco).

3.2 Produção e purificação da ferroquelatase de *Bacillus subtilis*

3.2.1 Expressão da proteína ferroquelatase de *Bacillus subtilis*

O vetor de expressão (pET28a) contendo a sequência de DNA, com His-tag, que codifica a proteína FECH de *Bacillus subtilis* (BsFECH) foi obtido comercialmente da *Epoch Life Science*. A BsFECH recombinante foi expressa em *E. coli*, cepa BL21(DE3).

As células competentes *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante por meio de choque térmico (60 segundos a 42 °C e 3 minutos a 4 °C). As bactérias transformadas foram incubadas a 37 °C e 200 rpm durante 45 minutos, em seguida, foram crescidas em meio LB-ágar, contendo canamicina (50 µg/mL), em estufa a 37 °C durante 16 horas.

Uma colônia de bactéria contendo o plasmídeo recombinante foi utilizada para fazer um pré-inóculo em meio LB, contendo canamicina na concentração 50 µg/mL. A cultura foi mantida a 37 °C e 200 rpm durante 16 horas. Em seguida, as células foram diluídas 100 vezes em meio LB, com a mesma concentração de canamicina, e cultivadas da mesma forma até OD_{600nm} = 0,4 - 0,6, então a expressão da proteína foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG e incubação a 30 °C por 4 horas.

3.2.2 Purificação da ferroquelatase de *Bacillus subtilis*

Após a verificação da expressão da BsFECH por SDS-PAGE 12% as células foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos a 7.000 rpm. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão A, adicionou-se 5U de DNase (Promega) e 30 µg/mL de lisozima (Sigma) e a mistura foi incubada em gelo por 1 hora. Em seguida, as células foram rompidas por ultrassom. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação, 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, e analisadas por SDS-PAGE 12%. Uma vez identificado que o produto recombinante de interesse encontrou-se na fração solúvel, a mesma foi filtrada em membrana de 0,45 µm e submetida às etapas de purificação.

A primeira etapa de purificação foi a cromatografia de afinidade ao níquel, uma vez que o níquel possui afinidade pela His-tag proveniente do vetor pET28a, fusionada com a proteína recombinante. Utilizou-se a coluna *HiTrap Chelating* (GE Healthcare LifeSciences) acoplada ao equipamento *Äkta Prime* (GE Healthcare LifeSciences). A

coluna foi equilibrada com solução A e a proteína foi eluída na solução B. A solução B contém alta concentração de imidazol (500 mM) que também possui afinidade pelo níquel, dessa forma, o imidazol compete com as histidinas pela ligação na resina, possibilitando a eluição da proteína. Em seguida, a His-tag foi clivada, com trombina (1U/mg de proteína) durante 12 h a 4°C, para evitar possíveis modificações nas propriedades da proteína devido à presença da cauda que possui 2 kDa de massa, que em relação ao tamanho da proteína poderia influenciar suas características.

A segunda etapa de purificação foi a cromatografia de exclusão por tamanho. Para tal, foi utilizada a coluna *HiLoad Superdex 200pg 26/60* (GE Healthcare LifeSciences) acoplada também ao equipamento *Äkta Prime* (GE Healthcare LifeSciences). A coluna foi equilibrada e a proteína eluída com solução C sob um fluxo de 1 mL/min. Ambas as etapas de purificação, bem como a clivagem da cauda foram acompanhadas por SDS-Page 12%.

3.2.3 Determinação da concentração da proteína

A concentração da BsFECH foi determinada pela absorbância em 280 nm levando-se em consideração a proteína desenhovelada em tampão fosfato 20 mM (pH 6,5) e clorohidrato de guanidina 6 M.³⁹ Para o cálculo da concentração empregou-se a lei de Beer-Lambert, expressa pela equação 3:

$$A = \varepsilon \times l \times C \quad (\text{equação 3})$$

em que, A é a absorbância, em unidades arbitrárias, ε é o coeficiente de extinção molar, em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, l é o caminho óptico em cm e C a concentração de proteína, em mol/L. O coeficiente de extinção molar da BsFECH foi estimado a partir da sequência de aminoácidos da proteína, utilizando-se o programa *Sednterp*. ($\varepsilon_{\text{BsFECH}} = 4,708.10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.3 Caracterização biofísica

Uma vez purificada iniciou-se a caracterização biofísica da BsFECH. Os ensaios biofísicos realizados forneceram informações a respeito da estrutura da proteína.

3.3.1 Dicroísmo circular (*Circular Dichroism – CD*)

A técnica de CD foi utilizada para obtenção de informações a respeito do padrão de estrutura secundária da BsFECH. Essa técnica é baseada na mudança de configuração de um estado fundamental para um estado excitado, quando a luz circularmente polarizada interage com um cromóforo opticamente ativo. Nas proteínas os principais cromóforos presentes são as estruturas aromáticas e as ligações amídicas.⁴⁰

Os experimentos foram realizados no espectropolarímetro J-815 (*Jasco Inc.*). Foram utilizados diferentes tampões (soluções tampão de D a I) para verificar se a concentração salina e o pH dos tampões afetam a estrutura secundária da proteína. Os espectros de CD foram coletados em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico e concentração de BsFECH 0,17 mg/mL nos tampões D e E e em cubeta de 0,2 mm de caminho óptico e concentração de BsFECH 0,5 mg/mL nos tampões de F a I.

Os valores obtidos na leitura de CD foram normalizados para elipticidade molar residual média a partir da equação 4.

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MM}{C \times l \times n} \quad (\text{equação 4})$$

em que, $[\theta]$ é a elipticidade molar residual, em graus.cm².dmol⁻¹, θ é a elipticidade em graus, MM é a massa molecular da proteína em kDa, C é a concentração da proteína em mg/mL, l é o caminho óptico em cm e n o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

A predição da estrutura secundária da proteína foi realizada a partir do programa *CDNN Deconvolution*.

3.3.2 Fluorescência intrínseca do triptofano

A técnica de fluorescência intrínseca do triptofano foi utilizada para obtenção de informações a respeito da estrutura terciária da proteína, utilizando-se como sonda os resíduos de triptofano da proteína.

Os experimentos foram realizados no espectrofotômetro *F-4500* (Hitachi), no tampão J utilizando-se cubeta de quartzo de 1,0 cm x 0,2 cm de caminho óptico e concentração de BsFECH 0,17 mg/mL. As amostras foram excitadas em 280 nm e os

espectros obtidos no intervalo de 300 nm a 420 nm. Com a finalidade de verificarmos o enovelamento da proteína os ensaios também foram realizados na presença de 6 M GndHCl, preparada no mesmo tampão utilizando-se as mesmas condições experimentais descritas acima.

3.3.3 Cromatografia de por tamanho analítica

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho analítica tem como objetivo fornecer informações acerca do estado oligomérico da proteína a partir da estimativa do Raio de Stokes (raio hidrodinâmico) experimental e da MM aparente da proteína, que são calculados utilizando-se o volume de eluição da proteína em estudo e o volume de eluição de um padrão de proteínas globulares com MM conhecida.

Para a realização do experimento utilizou-se a coluna *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare LifeSciences) acoplada ao equipamento *Äkta Prime* (GE Healthcare LifeSciences). A coluna foi equilibrada com tampão C e foram aplicados 100 µL da BsFECH (0,8 mg/mL), do padrão de proteínas (ferritina: 440 kDa, 61 Å; γ-globulina: 160 kDa, 48 Å; albumina sérica bovina: 67 kDa, 36 Å; ovoalbumina: 45 kDa, 30 Å; anidrase carbônica: 30 kDa, 24 Å; ribonuclease A: 14 kDa, 16 Å; todas a aproximadamente 1 mg/mL) e de blue dextran (1 mg/mL). Utilizando-se os volumes de eluição das proteínas do padrão e da BsFECH é possível calcular o coeficiente de partição (K_{av}), de acordo com a equação 5:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (\text{equação 5})$$

em que, V_t é o volume total da coluna, V_e é o volume de eluição das proteínas e V_o é o volume morto da coluna, determinado pelo volume de eluição do blue dextran.

Construindo-se um gráfico do logMM das proteínas do padrão em função dos valores de K_{av} calculados e ajustando-se linearmente os pontos é possível calcular a MM aparente da proteína. A partir da construção de um gráfico do raio de Stokes das proteínas do padrão em função de $-(\log K_{av})^{1/2}$ e ajustando-se linearmente os pontos é possível calcular o raio de Stokes experimental da proteína. A partir do raio de Stokes experimental e do raio de Stokes teórico da proteína (estimado a partir da sequência de aminoácidos da BsFECH pelo programa *Sednterp*) foi possível

determinar o valor da razão friccional, que fornece informações a respeito do formato estrutural da proteína em solução.

3.4 Estudos de estabilidade

Para investigar a estabilidade da proteína em diferentes concentrações de sal e em diferentes pH's foram realizados os experimentos de desenovelamento químico e térmico.

3.4.1 Desenovelamento químico

Para a realização do desenovelamento químico foram utilizadas as técnicas de CD e fluorescência. Os experimentos foram realizados em seis diferentes soluções tampão (tampões D, E, K, L, M e N) e concentração de BsFECH de 0,08 mg/mL. Em ambos os casos utilizou-se ureia como agente desnaturante, em concentrações crescentes (0 a 8 M), preparada no mesmo tampão da proteína.

O CD foi realizado em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm. Os dados foram coletados em 222 nm e normalizados para elipticidade molar residual, conforme descrito em 3.3.1. O valor de C_m (concentração de ureia em que 50% das espécies estão enoveladas e 50% desenoveladas) foi calculado a partir do software *OriginPro* 8.5 admitindo-se um ajuste sigmoidal para a transição do desenovelamento (ajuste *Dose-Response*).

A fluorescência foi realizada em cubeta de quartzo de 1,0 cm x 0,2 cm de caminho óptico. As amostras foram excitadas em 295 nm e os dados coletados de 300 nm a 420 nm. Os espectros coletados foram tratados para centro de massa espectral, segundo a equação 6:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum F_i \lambda_i}{\sum F_i} \quad (\text{equação 6})$$

em que, $\langle \lambda \rangle$ é o centro de massa espectral em nm, F_i a intensidade de fluorescência medida e λ_i o comprimento de onda correspondente à intensidade. O valor de C_m também foi estimado a partir do software *OriginPro* 8.5 mediante o ajuste *Dose-Response*.

3.4.2 Desenovelamento térmico

O desenovelamento térmico foi monitorado pela técnica de CD. Os experimentos foram realizados nas mesmas soluções tampões citadas em 3.4.1 utilizando-se a mesma concentração de proteína e a mesma cubeta. Os dados foram coletados em 222 nm variando-se a temperatura de 20 °C a 90 °C a uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. Os dados foram normalizados para elipticidade molar residual conforme descrito em 3.1.1 e o valor de T_m (temperatura em que 50% das espécies estão enoveladas e 50% desenoveladas) também foi calculado a partir do software *OriginPro 8.5* por meio do ajuste *Dose-Response*.

3.5 Estudos funcionais

A funcionalidade da BsFECH produzida foi avaliada a partir dos testes funcionais descritos nos itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3.

3.5.1. Interação entre TPPS e BsFECH

A interação entre a BsFECH e a porfirina solúvel 4,4',4'',4'''-(Porfirina-5,10,15,20-tetraí)tetraakis(ácido benzenesulfônico) (TPPS) foi estudada a partir da titulação espectrofotométrica acompanhada por UV-vis. O experimento foi realizado no tampão D utilizando-se espectrofotômetro Jasco V-630 e cubeta de quartzo de 1,0 cm x 0,2 cm de caminho óptico. Para avaliar a interação titulou-se concentrações crescentes de BsFECH (0,2 µM, 1 µM, 2 µM, 8 µM, 16 µM, 24 µM e 40 µM) em uma concentração constante de TPPS (2 µM), as amostras foram misturadas e incubadas a 30 °C por 30 minutos, em seguida prosseguiu-se com a leitura dos espectros no intervalo de 320 nm a 700 nm.

A variação no espectro de absorção da TPPS mediante a adição de BsFECH nos permite calcular a constante de associação da ligação BsFECH-TPPS, a partir do modelo proposto por Chenprakhon et al.⁴¹ conforme descrito a seguir, que leva em consideração o modelo de um sítio ligante. A ligação entre a TPPS e a BsFECH poder ser representada por:

e a constante de associação (K_a) é dada por:

$$K_a = \frac{[\text{BsFECH-TPPS}]}{[\text{BsFECH}][\text{TPPS}]} \quad (\text{equação 7})$$

sabendo-se que a constante de associação é o inverso da constante de dissociação temos:

$$K_d = \frac{[\text{BsFECH}][\text{TPPS}]}{[\text{BsFECH-TPPS}]} \quad (\text{equação 8})$$

assumindo-se que a BsFECH se liga à TPPS na proporção de 1:1 a razão entre a TPPS complexada ($[\text{BsFECH-TPPS}]$) e a concentração total de TPPS ($[\text{TPPS}]_0$) pode ser expressa como:

$$\alpha = \frac{[\text{BsFECH-TPPS}]}{[\text{TPPS}]_0} = \frac{[\text{BsFECH-TPPS}]}{[\text{TPPS}] + [\text{BsFECH-TPPS}]} \quad (\text{equação 9})$$

a partir dos rearranjos matemáticos adequados entre as equações 8 e 9 podemos reescrever α como:

$$\alpha = \frac{[\text{BsFECH}]}{K_d + [\text{BsFECH}]} \quad (\text{equação 10})$$

o valor de α também pode ser escrito em termos de variação de absorbância:

$$\alpha = \frac{\Delta A_{\text{BsFECH}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \quad (\text{equação 11})$$

em que, ΔA_{BsFECH} é a variação de absorbância em 422 nm dada pela subtração entre o valor da absorbância em determinada concentração de BsFECH e o valor da absorbância da porfirina livre, na ausência da BsFECH, e $\Delta A_{\text{máx}}$ é a variação máxima no valor na intensidade de absorção em 422 nm, ou seja, quando toda a TPPS está saturada com BsFECH.

A simples aproximação de $[\text{BsFECH}] \approx [\text{BsFECH}]_0$ nos permite modificar a equação 10:

$$\alpha = \frac{[\text{BsFECH}]_0}{K_d + [\text{BsFECH}]_0} = \frac{\Delta A_{\text{BsFECH}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \quad (\text{equação 12})$$

A construção de um gráfico de ΔA_{BsFECH} versus $[\text{BsFECH}]_0$ permite a obtenção do valor de $\Delta A_{\text{máx}}$, que é utilizado para o cálculo do valor de α , a partir da equação 11, que por sua vez, é utilizado para calcular a $[\text{BsFECH}]$ livre em cada titulação:

$$[\text{BsFECH}]_{\text{livre}} = [\text{BsFECH}]_0 - [\text{BsFECH} - \text{TPPS}] \quad (\text{equação 13})$$

$$[\text{BsFECH}]_{\text{livre}} = [\text{BsFECH}]_0 - \alpha[\text{TPPS}]_0 \quad (\text{equação 14})$$

O valor de K_d é então determinado a partir de um gráfico de α versus $[\text{BsFECH}]_{\text{livre}}$, de acordo com a equação 10.⁴¹

3.5.2 Reação de inserção de íons zinco na TPPS

A reação de inserção de íons Zinco, adicionado na forma de acetato de zinco, na TPPS foi acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis, utilizando-se leitor de placas *Thermo Scientific* modelo *Multiskan GO* com acessório para leitura de cubetas. O experimento foi realizado no tampão D, na temperatura de 30 °C utilizando-se placa de 96 poços. Na reação catalisada, a BsFECH (40 µM) e a TPPS (2 µM) foram misturadas e incubadas a 30 °C por 30 minutos e após esse período adicionou-se acetato de zinco em diferentes concentrações (25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM e 300 µM). Na reação não catalisada a TPPS (2 µM) foi incubada pelo mesmo período de tempo na mesma temperatura adicionando-se a as mesmas concentrações de acetato de zinco. Os espectros foram coletados durante 6 horas de 30 em 30 minutos no intervalo de 300 nm a 700 nm.

Levando-se em consideração a concentração de BsFECH constante ($[\text{BsFECH}] = 40 \mu\text{M}$) e em excesso em relação à concentração da TPPS ($[\text{TPPS}] = 2 \mu\text{M}$) a FECH se liga à TPPS:

e o complexo $[\text{BsFECH}, \text{TPPS}]$ torna-se o reagente para o Zn(II) :

forma-se assim um composto ternário como reagente final para a reação catalítica, formando a ZnTPPS:

sob as condições atuais a taxa de formação da ZnTPPS segue a lei de velocidade:

$$-\frac{d[\text{TPPS,BsFECH}]}{dt} = k_{\text{obs}} * [\text{TPPS, BsFECH}] \quad (\text{equação 15})$$

em que:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 * K_{\text{Ligação}} * [\text{Zn(II)}]}{1 + K_{\text{Ligação}} * [\text{Zn(II)}]} \quad (\text{equação 16})$$

o valor de k_{obs} para cada concentração de acetato de zinco foi determinada a partir do ajuste não linear da curva gerada pelo gráfico da intensidade de absorbância em 421 nm *versus* tempo de reação. Uma vez determinados os valores de K_{obs} os valores de k_2 (constante de dissociação da BsFECH do composto ternário formando o composto ZnTPPS) e $K_{\text{Ligação}}$ (constante de ligação do Zn^{2+} ao composto BsFECH,TPPS para a formação do composto ternário) são determinados a partir do ajuste não linear do gráfico de k_{obs} *versus* $[\text{Zn}^{2+}]$.⁴²

3.5.3 Reação de inserção de íons zinco na Mb

Estudos atuais²⁵ apontaram um novo mecanismo para a formação da ZnPP durante a maturação do presunto Parma, que envolve proteólises e formação de peptídeos fluorescentes de baixa massa molecular, pela atividade proteolítica de catepsinas endógenas. Para verificar essa hipótese testamos inicialmente a interação entre a BsFECH e a Mb (do músculo esquelético equino – *Sigma*) a partir da reação

de *cross-linking* utilizando-se como reagente o dissuccinimidil suberato (DSS). Para tal, incubou-se a BsFECH (50 μ M), a Mb (50 μ M) e uma mistura de BsFECH e Mb (50 μ M cada) a 30 °C durante 1 hora. Em seguida, adicionou-se 2,5 mM de DSS e incubou-se a 25 °C durante 30 minutos, após esse período adicionou-se Tris-HCl (pH 7,5) na concentração de 50 mM para parar a reação. Para as reações de controle realizou-se o mesmo procedimento, no entanto, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) ao invés de DSS. A interação foi verificada por SDS-Page 12%.

Em seguida, avaliamos se a BsFECH recombinante produzida é ativa com o substrato Mb na presença de íons Zn(II). Para tal, a Mb foi incubada em uma solução livre de oxigênio contendo ácido ascórbico, para manutenção do meio redutor, e acetato de zinco durante 24 horas a 30 °C, na presença e na ausência de BsFECH. Após o período de incubação a reação foi monitorada por fluorescência, as amostras foram excitadas em 420 nm e os espectros foram obtidos no intervalo de 550 nm a 695 nm. Para assegurar que a temperatura de incubação não afeta o estado nativo da mioglobina, o que pode facilitar a reação de transmetalção, monitorou-se a estrutura secundária da Mb a partir do CD. A Mb foi incubada no tampão D na concentração de 0,17 mg/mL a 30 °C e os espectros foram coletados de uma em uma hora durante 12 horas, os valores obtidos na leitura de CD foram normalizados para elipticidade molar residual média a partir da equação 4.

Posteriormente, foram realizados experimentos para avaliar como a proteólise da Mb afeta a reação de transmetalção. Para tal, amostras de 1 mM de metamioglobina (dissolvidas em água) foram incubadas com pepsina da mucosa estomacal suína (dissolvida em 50 mM de tampão acetato, pH 4,5), na razão de 90:1, a 37 °C, em diferentes tempos de incubação (5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos). Após o tempo de incubação foram adicionados volumes iguais de NaHCO₃ 0,6 M e NaOH 0,1 M com a finalidade de neutralizar o pH da reação e inibir assim a reação de proteólise. Para todas as amostras da reação de proteólise o pH foi mensurado imediatamente após a digestão com a pepsina e após o ajuste para as condições neutras. A proteólise frente aos diferentes tempos de incubação foi verificada por SDS-Page 15%. Em seguida, os experimentos foram realizados nas mesmas condições descritas acima para comparar a reação de transmetalção na mioglobina nativa e na mioglobina após diferentes graus de degradação com pepsina, no entanto utilizando-se excesso de acetato de zinco para favorecer a reação de inserção dos

íons Zn(II). Amostras de Mb nativa na presença e na ausência de BsFECH e amostras de Mb degradadas com pepsina por 5, 10, 60 e 90 minutos foram incubadas em uma solução livre de oxigênio contendo ácido ascórbico e 100 µM de acetato de zinco. A formação da Zn-Mb foi monitorada pela fluorescência emitida em 590 nm.

Os resultados mostraram que a Mb gerada pela leve degradação com pepsina (5 minutos) é melhor substrato para a reação de transmetalção, sendo assim, com a finalidade de identificarmos qual o fragmento da Mb está presente nessa fração as amostras foram submetidas à análise por LC/MS. A separação foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra-performance (UPLC) *Accele 1250* (Thermo Scientific), acoplado ao espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Scientific) equipado com interface *electrospray HESI-II*. A separação foi realizada na coluna *Aeris XB-C18* (15 cm x 2.1 mm x 3.6 µm; Phenomenex) utilizando-se como fase móvel solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila na proporção 1:1 sob um fluxo de 0,4 mL/min.

A deconvolução do espectro de massas permitiu a identificação das massas dos polipeptídeos formados durante a digestão por 5 minutos. A partir das massas obtidas e da estrutura primária da metamioglobina utilizou-se o software *Peptide Cutter* (Expasy) para fazer predição da estrutura primária dos polipeptídeos gerados e a partir da estrutura primária predita, utilizando-se o software *Phyre*², foi possível realizar a modelagem por homologia do polipeptídeo majoritário formado.⁴³

4 Resultados e Discussão

4.1 Produção e purificação da BsFECH

A BsFECH recombinante foi expressa em células *E. coli* BL21(DE3) conforme descrito no item 3.2.1. A proteína foi expressa na forma solúvel e com alto grau de pureza a partir de duas etapas cromatográficas, cromatografia de afinidade ao níquel seguida por cromatografia de exclusão por tamanho. Entre as etapas cromatográficas foi clivada a His-Tag mediante ação da trombina. As etapas de produção e purificação da BsFECH foram monitoradas por SDS-PAGE 12%, conforme mostra a Figura 10.

Figura 10 - SDS-PAGE 12% mostrando as etapas de produção e purificação da BsFECH. 1) Marcador de massa molecular; 2) Cultura não induzida; 3) Cultura induzida; 4) Fração insolúvel; 5) Fração solúvel contendo a BsFECH recombinante; 6) Fração após a cromatografia de afinidade ao níquel; 7) Fração após a clivagem da His-Tag e da cromatografia de exclusão por tamanho.

4.2 Caracterização Biofísica

4.2.1 Estrutura secundária

A técnica de CD foi utilizada para verificarmos se a BsFECH foi produzida e purificada no estado enovelado, para fazer uma predição da estrutura secundária da proteína e para avaliar a possível interferência de diferentes tampões nessa estrutura (tampões D, E, F, G, H e I citados na tabela 1). Os espectros obtidos estão

apresentados na Figura 11 e a predição da estrutura secundária, realizada a partir do programa *CDNN Deconvolution*, está apresentada na Tabela 2.

Figura 11 - Espectros de CD da BsFECH em diferentes tampões.

Tabela 2 - Estimativa da estrutura secundária da BsFECH recombinante em diferentes tampões a partir do programa *CDNN Deconvolution*.

Tampão	Teórico ³¹	D	E	F	G	H	I
α-hélice	51 %	36 %	38 %	42 %	42 %	42 %	44%
Folha β	20 %	16 %	15%	15 %	15 %	14 %	13 %

Os diferentes elementos estruturais de uma proteína possuem espectros de CD característicos, por exemplo, proteínas constituídas principalmente por α-hélices possuem bandas negativas em 222 nm e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm, proteínas com predominância de folhas β antiparalela possuem uma banda negativa em 218 nm e uma positiva em 195 nm, já as estruturas não ordenadas (estrutura randômica) possuem uma elipticidade positiva muito baixa em 210 nm e bandas negativas em aproximadamente 195 nm.⁴⁰

Sendo assim, a partir dos espectros e da deconvolução destes pode-se inferir que a BsFECH foi produzida enovelada e é constituída tanto por folhas β quanto por α-hélices, sendo a última predominante. Observa-se também que mudanças no pH e na concentração salina do tampão não provocaram alterações significativas na estrutura secundária da proteína.

4.2.2 Estrutura terciária

A presença de estrutura terciária na BsFECH foi verificada pela técnica de espectroscopia de fluorescência utilizando-se os triptofanos da proteína como sonda. O espectro de emissão de fluorescência do triptofano reflete o ambiente ao qual este está envolvido. Os resíduos de triptofano em um ambiente completamente apolar, ou seja, quando o triptofano está protegido do solvente apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão < 330 nm, a medida que o triptofano torna-se mais exposto ao solvente o $\lambda_{\text{máx}}$ desloca-se para comprimentos de ondas maiores ($340 \text{ nm} < \lambda_{\text{máx}} < 350 \text{ nm}$).

A BsFECH possui 4 triptofanos (Trp147, Trp157, Trp220 e Trp230) e o seu espectro de fluorescência indica que esses podem estar parcialmente expostos ao solvente, uma vez que o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão observado para a proteína na forma nativa foi de 343 nm. Na presença do agente desnaturante GndHCl (6 M) observou-se uma forte diminuição na intensidade de fluorescência e o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão para 349 nm, indicando uma maior exposição dos triptofanos ao solvente, proveniente do desenovelamento da proteína. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a proteína produzida apresenta estrutura terciária. Os espectros de emissão de fluorescência obtidos estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Espectros de emissão de fluorescência da BsFECH na forma nativa e desenovelada (6 M de GndHCl).

4.2.3 Caracterização hidrodinâmica

A BsFECH produzida e purificada foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho analítica para inferirmos informações acerca da proteína em solução. Procedendo-se conforme descrito no item 3.3.3 determinou-se a massa molecular aparente (MMap) e o raio de Stokes experimental (R_s) da proteína a partir do volume de eluição da proteína e dos volumes de eluição de um padrão de proteínas (Figura 13).

Figura 13 – Resultados obtidos a partir da cromatografia de exclusão por tamanho analítica. **A)** Padrão de eluição cromatográfica da BsFECH e das proteínas do padrão (1. Ferritina – 440kDa/ R_s 61Å; 2. γ -glubulina – 160kDa/ R_s 48Å; 3. BSA – 67kDa/ R_s 36Å; 4. Ovoalbumina – 45kDa/ R_s 30Å; 5. Anidrase Carbônica – 30kDa/ R_s 24Å; 6. Ribonuclease A 13,7kDa/16,4Å). **B)** Estimativa da massa molecular aparente. **C)** Estimativa do Raio de Stokes.

A BsFECH eluiu com um volume muito próximo ao da Ovoalbumina, que possui MM de 45 kDa. Considerando-se o tamanho real da proteína, 36 kDa, a mesma eluiu com uma MM aparente maior que o esperado (MMap = 45 kDa), porém, não o suficiente para ser um dímero, indicando assim que a proteína se comporta como um

monômero alongado em solução, fazendo com que o volume de eluição seja maior do que seria para uma proteína globular. Para verificarmos a assimetria da proteína estimou-se o raio de Stokes experimental (R_s) e a partir da razão deste pelo teórico (R_0) determinou-se a razão friccional (R_s/R_0). O valor de R_0 reflete o raio de uma esfera de mesma MM que a proteína em estudo e foi estimado pelo programa *Sednterp* a partir da sequência de aminoácidos da BsFECH. O valor de R_s calculado foi de 30 Å e o de R_0 estimado foi de 22 Å, o que nos forneceu uma R_s/R_0 de 1,4. A razão friccional reflete a assimetria da proteína, sendo que quanto maior que 1 seu valor mais assimétrica é a proteína, dessa forma conclui-se que a BsFECH comporta-se como um monômero alongado em solução. O sumário dos resultados obtidos a partir do tratamento dos dados está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Sumário dos resultados obtidos na cromatografia de exclusão por tamanho analítica.

Volume de eluição (mL)	MMap (kDa)	R_s (Å)	R_0 (Å)	R_s/R_0
14,8	45	30	22	1,4

4.3 Estudos de estabilidade

4.3.1 Estabilidade química

A estabilidade da BsFECH frente ao agente desnaturante ureia foi verificada em diferentes concentrações de sal e pH, conforme descrito no item 3.4.1, a partir dos ensaios de CD e fluorescência intrínseca do triptofano. Os perfis de desenovelamento estão apresentados na Figura 14 e os valores de C_m estão apresentados na Tabela 4.

Figura 14 - Perfis de estabilidade química determinados por CD e fluorescência. **A)** Ensaios de CD realizados em tampões com diferentes concentrações de sal no pH 5,7. **B)** Ensaios de fluorescência realizados nas mesmas condições de A. **C)** Ensaios de CD realizados em tampões com diferentes concentrações de sal no pH 7,4. **D)** Ensaios de fluorescência realizados nas mesmas condições de C.

Tabela 4 - Valores de C_m calculados a partir do ajuste sigmoidal Dose-Response dos perfis de estabilidade térmica determinados por CD e Fluorescência apresentados na Figura 14.

	CD		FLUORESCÊNCIA	
	C_{m1} (M de Urea)	C_{m2} (M de Urea)	C_{m1} (M de Urea)	C_{m2} (M de Urea)
Tampão K (sem adição NaCl; pH 5,7)	$1,0 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$
Tampão D (200 mM NaCl; pH 5,7)	$2,8 \pm 0,1$	N/A	$2,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$
Tampão L (500 mM NaCl; pH 5,7)	$2,7 \pm 0,1$	N/A	$2,1 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
Tampão M (sem adição NaCl; pH 7,4)	$2,7 \pm 0,1$	N/A	$2,2 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
Tampão E (200 mM NaCl; pH 7,4)	$3,0 \pm 0,1$	N/A	$2,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
Tampão N (500 mM NaCl; pH 7,4)	$3,5 \pm 0,1$	N/A	$2,9 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$

Os perfis de desenovelamento gerados por fluorescência indicam a possível ocorrência de duas transições, uma transição que possivelmente “esconde” um ou mais triptofanos, que, inclusive pode ser por oligomerização (C_{m1}), e uma transição referente à exposição dos triptofanos ao solvente sugerindo a perda da estrutura terciária (C_{m2}). Nos experimentos realizados em pH 5,7 nota-se um aumento de C_{m1} com o aumento da concentração de sal, enquanto que os valores de C_{m2} permanecem praticamente constantes, ou seja, a primeira transição é estabilizada pelo aumento da concentração de sal, enquanto que, a segunda é pouco influenciada. Nota-se, nos experimentos realizados em pH 7,4, um aumento tanto no valor de C_{m1} quanto de C_{m2} com o aumento da concentração de sal, ou seja, ambas as transições são estabilizadas pelo aumento da concentração de NaCl. Quando comparamos os resultados gerados nos tampões com mesma concentração de sal e diferentes concentrações hidrogeniônicas observamos que ambos os valores de C_m são maiores em meio com $C_{H^+} = 10^{-7,4}$ M.

Dessa forma concluímos que, tanto em termos de estrutura secundária quanto de estrutura terciária, em ambas as concentrações hidrogeniônicas verifica-se que o aumento da concentração de sal favorece a estabilização da BsFECH.

4.3.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da BsFECH foi verificada em diferentes concentrações de sal e pH, conforme descrito no item 3.4.2, a partir dos ensaios de CD. Os perfis de desenovelamento estão apresentados na Figura 15 e os valores de T_m estão apresentados na Tabela 5.

Figura 15 - Perfis de estabilidade térmica determinados por CD. **A)** Ensaios realizados em tampões com diferentes concentrações de sal no pH 5,7. **B)** Ensaios realizados em tampões com diferentes concentrações de sal no pH 7,4.

Tabela 5 - Valores de T_m calculados a partir do ajuste sigmoidal Dose-Response dos perfis de estabilidade térmica determinados por CD apresentados na figura 15.

	CD	
	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
Tampão K (sem adição NaCl; pH 5,7)	48,2 ± 0,1	N/A
Tampão D (200 mM NaCl; pH 5,7)	51,2 ± 0,2	73,9 ± 0,4
Tampão L (500 mM NaCl; pH 5,7)	58,0 ± 0,1	N/A
Tampão M (sem adição NaCl; pH 7,4)	53,7 ± 0,2	N/A
Tampão E (200 mM NaCl; pH 7,4)	55,8 ± 0,2	N/A
Tampão N (500 mM NaCl; pH 7,4)	56,0 ± 0,2	73,8 ± 0,2

Comparando-se os perfis de desenovelamento gerados e os valores de T_m observa-se que, assim como nos experimentos de estabilidade química, o aumento da concentração de sal favorece o aumento de estabilidade da BsFECH e essa é mais estável no pH 7,4.

Os resultados de estabilidade obtidos são favoráveis em relação à concentração de sal, uma vez que, a produção das carnes curadas é realizada em

altas concentrações de sal, no entanto, não são favoráveis em relação ao pH, uma vez que, no pH da carne (geralmente entre 5,5 e 6,5) a estabilidade da BsFECH é menor que em pH mais altos.

4.4. Estudos funcionais

4.1.1 Interação entre a TPPS e BsFECH

A interação entre a TPPS e a BsFECH foi verificada através da titulação da proteína na porfirina conforme descrito no item 3.5.1. Os espectros de absorção obtidos estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de absorção para a titulação da TPPS na BSFECH. **A)** Alterações provocadas na banda Soret devido á titulação da TPPS, em concentração fixa (2 μ M), com a BsFECH, em concentrações crescentes (sem adição, 0,2 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 24 μ M e 40 μ M). **B)** Alterações provocadas na banda Soret devido à adição de BsFECH. **C)** Alterações provocadas nas bandas Q devido à adição de BsFECH.

Na ausência da BsFECH observa-se o espectro característico da TPPS base livre com banda Soret em 412 nm e bandas Q em 516, 553, 578 e 635 nm. A adição da BsFECH provoca alterações na intensidade e posição das bandas. Inicialmente pequenas concentrações de BsFECH promovem uma diminuição da intensidade da

banda Soret em 412 nm e um ligeiro deslocamento dessa para maiores comprimentos de onda. A partir da concentração de 8 μM de BsFECH a banda Soret é deslocada totalmente para 421 nm e o aumento contínuo da concentração de proteína promove o aumento da intensidade da banda nesse comprimento de onda. O mesmo foi observado para as bandas Q, evidenciando-se uma diminuição da intensidade dessas bandas nos comprimentos de onda iniciais, nas concentrações mais baixas de proteína, ocorrendo um deslocamento para maiores comprimentos de onda (519, 555, 590 e 645 nm, respectivamente) e aumento a intensidade das bandas nesses comprimentos.

As mudanças espectrais observadas na Figura 16 permitem o cálculo da constante de afinidade da BsFECH à TPPS em solução aquosa no pH 5,7 a 30 °C conforme descrito em 3.5.1. Construindo-se um gráfico dos valores de ΔA_{BsFECH} versus $[\text{BsFECH}]_0$ (Figura 17 A) obtemos o valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ (1,5314 U.A.) a partir do ajuste hiperbólico e análise de regressão não linear. O valor de $\Delta A_{\text{BsFECH}} / \Delta A_{\text{máx}}$ ou α é utilizado para calcular a quantidade de BsFECH livre em cada titulação, permitindo-se assim a construção de um gráfico de α versus $[\text{BsFECH}]_{\text{livre}}$ (Figura 17 B), em que, o valor de K_d é obtido a partir do ajuste hiperbólico e análise de regressão não linear do gráfico. O valor de K_d obtido foi de $2,62 \times 10^{-6}$ M. Sabendo-se que a constante de afinidade é o inverso da constante de dissociação podemos calcular o valor da constante de afinidade entre a BsFECH e a TPPS como $3,81 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Figura 17 – Cálculo da constante de afinidade entre a TPPS e a BsFECH em solução aquosa no pH 5,7 a 30 °C. **A)** Gráfico de ΔA_{BsFECH} ($\lambda_{\text{Abs}} = 422 \text{ nm}$) versus $[\text{BsFECH}]_0$ para determinação do valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ a partir do ajuste hiperbólico e análise de regressão não linear. **B)** Gráfico de α versus $[\text{BsFECH}]_{\text{livre}}$ para determinação do valor de K_d a partir do ajuste hiperbólico e análise de regressão não linear.

Tem sido postulado que a BsFECH desempenha um papel importante durante a reação catalítica forçando uma distorção do anel da porfirina para uma conformação em que os elétrons dos dois nitrogênios pirrólicos estão mais acessíveis a entrada do substrato íon metálico. As alterações no espectro de UV mostradas na Figura 16 são resultados dessa deformação. A alteração espectral confirma que a BsFECH recombinante purificada nesse estudo é ativa e capaz de ligar-se ao anel da porfirina TPPS, com uma constante de afinidade de $3,81 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, e induzir as mudanças conformacionais requeridas para a reação de transmetalção.

4.1.2 Reação de inserção de íons zinco na TPPS

A reação de inserção de íons zinco na TPPS foi acompanhada por espectrofotometria de UV-Vis conforme descrito no item 3.5.2. Os espectros de absorção obtidos para a reação não catalisada e catalisada na presença de 100 μM de acetato de zinco estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Espectros de absorção para a reação não catalisada e catalisada de inserção de íons zinco (100 μM) na TPPS (1 μM). **A)** Alterações provocadas na banda Soret em função do tempo para a reação não catalisada. **B)** Variação de absorbância nos comprimentos de onda de decaimento ($\lambda = 413 \text{ nm}$) e aumento ($\lambda = 420 \text{ nm}$) de intensidade da banda Soret, mostrando que a intensidade de absorbância em 420 nm é maior que em 413 nm após 4 horas para a reação não catalisada. **C)** Alterações provocadas na banda Soret em função do tempo para a reação catalisada. **D)** Variação de absorbância nos comprimentos de onda de decaimento ($\lambda = 421 \text{ nm}$) e aumento ($\lambda = 430 \text{ nm}$) de intensidade da banda Soret, mostrando que a intensidade de absorbância em 430 nm é maior que em 421 após 1,5 horas para a reação catalisada.

Na presença de excesso de íons Zn(II) é possível perceber uma diferença, em relação a banda Soret no tempo zero, entre os espectros de absorção da TPPS na ausência e presença da BsFECH. Ambas as reações formam um produto em comum, porém, em diferentes taxas de velocidade. Na reação não catalisada a banda Soret está localizada em 413 nm, já na reação catalisada a banda está localizada em 421 nm, essa diferença ocorre uma vez que a TPPS interage com a BsFECH, conforme mostrado anteriormente, antes da inserção dos íons Zn(II) . Tanto na reação não enzimática quanto na enzimática observa-se o mesmo padrão de mudança nos espectros de absorção, ocorrendo um decaimento da intensidade das bandas no comprimento de onda inicial, um ligeiro deslocamento destas para comprimentos de ondas maiores (420 nm e 430 nm nas reações não catalisada e catalisada, respectivamente), seguido pelo aumento da intensidade das bandas, neste

comprimento de onda, com o decorrer do tempo. Para os experimentos realizados nas demais concentrações de acetato de zinco foi observado o mesmo perfil de mudança espectral. Observa-se que a intensidade de absorbância da banda deslocada torna-se maior que a intensidade de absorbância da banda inicial no tempo de 4 horas para a reação não catalisada e de 1,5 horas para a reação catalisada, confirmando assim, que a enzima recombinante purificada é ativa e capaz de acelerar a reação de inserção de íons Zn(II) na TPPS.

Os tempos de decaimento da TPPS e de formação da ZnTPPS, conforme mostrado na Figura 18, correspondem a uma cinética de primeira ordem de acordo com o passo determinante intramolecular seguindo a rápida formação de um complexo bimolecular. Os valores da constante de primeira ordem observada, k_{obs} , para cada concentração de acetato de zinco adicionada foram calculados a partir do ajuste não linear da curva gerada pelo gráfico de tempo de reação versus absorbância em 421 nm. Os gráficos gerados para cada concentração estão apresentados na Figura 19 e os valores de k_{obs} obtidos na Tabela 6.

Figura 19 – Gráfico da intensidade de absorbância (em $\lambda = 421$ nm) versus tempo de reação (em horas) para as diferentes concentrações de acetato de zinco. A partir do ajuste não linear das curvas geradas foi possível calcular o valor de k_{obs} para cada concentração de acetato de zinco.

Tabela 6 – Valores de k_{obs} obtidos, a partir do ajuste não linear das curvas mostradas na Figura 20, para cada concentração de acetato de zinco.

[Zn ²⁺] (μM)	25	50	100	150	200	300
k_{obs} (h ⁻¹)	0,18 ± 0,03	0,25±0,04	0,35 ±0,06	0,44 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,53 ± 0,08

A partir dos valores de k_{obs} calculados construiu-se um gráfico de k_{obs} versus concentração de Zn(II) (Figura 20), sendo que o ajuste não linear desse gráfico permitiu o cálculo dos valores de k_2 e $K_{Ligação}$, a partir da equação 16. O valor de k_{obs} aumenta com o aumento da concentração de íons Zn(II), no entanto, aproxima-se de um valor limite, conforme mostrado na Figura 20. A taxa limite é determinada pelo k_2 para o decaimento unimolecular do composto ternário enzima-substrato-Zn²⁺. Para as condições atuais os valores calculados foram $k_2 = 6,6 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $K_{Ligação} = 1,3 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 20 – Gráfico de k_{obs} versus concentração de acetato de zinco. A partir do ajuste não linear do gráfico (equação 16) calculou-se os valores de k_2 e $K_{Ligação}$.

Utilizando-se a TPPS como substrato mostrou-se que a atividade da BsFECH é preservada durante a purificação da enzima, e essa pode ser verificada pela ligação

dos íons Zn(II) ao substrato [BsFECH,TPPS], em que a ligação da TPPS à BsFECH promove uma distorção no anel da porfirina que facilita a inserção dos íons.

4.1.3 Interação entre BsFECH e Mb

Para avaliarmos a hipótese do novo mecanismo proposto para a formação da ZnPP testamos inicialmente a interação entre a BsFECH e a Mb, a partir da reação de *cross-linking* conforme descrito em 3.5.3. A reação de *cross-linking* envolve a utilização de um reagente bifuncional contendo grupos finais reativos que reagem com grupos funcionais específicos dos resíduos de aminoácidos das proteínas, formando ligações covalentes entre dois resíduos espacialmente próximos dentro de um único peptídeo ou entre duas cadeias polipeptídicas. O DSS, é um éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) homobifuncional, os grupos funcionais desse reagente são aminoreativos, ou seja, reagem com as aminas primárias presentes na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica e nos resíduos de lisina das proteínas, formando ligações amídicas estáveis.⁴⁴

A reação foi verificada por SDS-PAGE, sendo possível observar o aparecimento de uma banda entre os padrões de massa de 66 kDa e 45 kDa. Essa banda está possivelmente relacionada à interação entre a Mb (18 kDa) e a BsFECH (45 kDa), e à formação de um complexo Mb-BsFECH, em que espera-se uma MM aparente de aproximadamente 63 kDa. A Figura 21 mostra o gel SDS-PAGE referente ao experimento realizado. A seta vermelha indica a banda formada, referente ao complexo Mb-BsFECH, após a reação com DSS.

Figura 21 - SDS-Page 12% mostrando o experimento *de cross-linking* com DSS. 1) Padrão de massa molecular; 2) BsFECH sem DSS; 3) BsFECH com DSS; 4) Mb sem DSS; 5) Mb com DSS; 6) BsFECH + Mb sem DSS; 7) BsFECH + Mb com DSS. Todas as amostras foram incubadas por 1 hora a 30°C e em seguida adicionou-se o reagente DSS às amostras 3, 5 e 7. A seta vermelha indica a banda formada após a reação com DSS.

Em seguida, foi verificada a atividade catalítica da BsFECH recombinante purificada na reação de transmetalção frente ao substrato Mb conforme descrito no item 3.5.3. Os espectros de fluorescência obtidos para a reação na presença e na ausência da BsFECH estão apresentados na Figura 22 A. Observa-se no espectro da reação catalisada a presença de uma banda intensa em 636 nm referente à banda da PPIX livre, mostrando assim, que a enzima purificada é ativa e capaz de acelerar a reação reversa, ou seja, a remoção dos íons Fe(II) do anel do heme gerando a PPIX livre que será o substrato para a inserção dos íons Zn(II). Para assegurarmos que a temperatura de incubação não afetou a estrutura nativa da Mb facilitando a inserção dos íons Zn(II) monitoramos a partir da técnica de CD a estrutura secundária da Mb. Os espectros obtidos estão mostrados na Figura 23 B, sendo que nenhuma mudança significativa foi observada na estrutura nativa da mioglobina após 12 horas de incubação à 30 °C.

Figura 22 – Reação de transmetalção da Mb catalisada pela BsFECH recombinante. **A)** Espectros de fluorescência para a reação catalisada e não catalisada, a presença de uma intensa banda em 590 nm no espectro da reação catalisada indica a formação do complexo fluorescente Zn-Mb. **B)** Acompanhamento por CD de possíveis alterações na estrutura da Mb.

Uma vez evidenciado que a BsFECH recombinante produzida é capaz de promover a remoção dos íons Fe(II) do grupo heme da Mb, foram realizados experimentos para avaliar como a proteólise da Mb afeta a reação de remoção de Fe(II) e inserção de íons Zn(II), conforme descrito no item 3.5.3. A Figura 23 mostra o gel SDS-PAGE pelo qual a proteólise foi acompanhada.

Figura 23 – Gel SDS-PAGE 15% mostrando a proteólise da mioglobina com pepsina em função do tempo de incubação. 1) Padrão de massa molecular; 2,3,4) Mb na presença de pepsina tempo zero; 5) Mb após 5 minutos de proteólise; 6) Mb após 10 minutos de proteólise; 7) Mb após 15 minutos de proteólise; 8) Mb após 30 minutos de proteólise; 9) Mb após 60 minutos de proteólise; 10) Mb após 90 minutos de proteólise; 11) Mb após 120 minutos de proteólise.

Podemos observar que a Mb sofre uma degradação limitada quando incubada em curtos períodos de tempo (5, 10 e 15 minutos), enquanto que após longos períodos de incubação (de 30 a 120 minutos) ela é altamente degradada. A influência dos

diferentes graus de degradação da Mb na reação de transmetalização catalisada pela BsFECH recombinante foi verificada conforme descrito no item 3.5.3. A Figura 24 mostra a intensidade de fluorescência em 590 nm referente a formação do complexo Zn-Mb para os diferentes graus de degradação da Mb.

Figura 24 – Intensidade de fluorescência em 590 nm para as reações de transmetalização na presença de 100 μ M de acetato de zinco. 1) Mb nativa; 2) Mb nativa na presença de 40 μ M de BsFECH; 3) Mb após 5 minutos de proteólise com pepsina na presença de 40 μ M de BsFECH; 4) Mb após 10 minutos de proteólise com pepsina na presença de 40 μ M de BsFECH; 5) Mb após 60 minutos de proteólise com pepsina na presença de 40 μ M de BsFECH; 6) Mb após 90 minutos de proteólise com pepsina na presença de 40 μ M de BsFECH.

Podemos observar maiores intensidades de fluorescência nas reações em que a Mb levemente degradada está presente. Sendo assim, é evidente que a leve degradação da mioglobina (5 e 10 minutos e incubação com pepsina) forma espécies de Mb que são substratos melhores para a reação de transmetalização catalisada pela BsFECH, quando comparados à Mb nativa e à Mb degradada por períodos de tempo mais longos. Para identificar qual fragmento da Mb está presente nessa fração as amostras foram submetidas à análise por LC/MS, conforme descrito anteriormente e os cromatogramas e espectros de massas obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos para diferentes espécies de mioglobina. **A)** LC/MS da solução aquosa de Mb nativa; **B)** Espectro de massas para o pico com tempo de eluição em 12,76 minutos levando a uma massa molecular de 16,9 kDa após a deconvolução do espectro, referindo-se a massa da apomioglobina; **C)** LC/MS da solução aquosa de Mb após 5 minutos de digestão com pepsina; **D)** Espectro de massas para o pico com tempos de eluição em 11,75 e 11,92 minutos fornecendo evidências de um componente peptídico minoritário de massa molecular 13,5 kDa e um majoritário de MM de 13,8 kDa, respectivamente, após a deconvolução do espectro.

A partir dos cromatogramas observamos que a Mb nativa e a Mb parcialmente digerida por 5 minutos eluem em tempos diferentes. A Mb nativa eluiu em 12,76 minutos e a partir da deconvolução do espectro de massas para esse pico obtemos um peptídeo de massa molecular de 16,9 kDa, que refere-se a apomioglobina. A Mb digerida por 5 minutos eluiu em 11,75 e 11,92 minutos e a partir da deconvolução do espectro de massas para esses picos podemos observar que duas proteínas parcialmente proteolisadas são formadas, uma minoritária com MM de 13,5 kDa, referente a eluição em 11,75 minutos, e uma majoritária com massa molecular de 13,8 kDa. O fragmento da mioglobina parcialmente degradada com MM de aproximadamente 13 kDa é compatível com a espécie conhecida como “mini-mioglobina”, que é constituída pelos resíduos 32 a 139 da mioglobina nativa e é formada pela proteólise

da extremidade C-terminal do polipeptídio ^{45,46}. Estudos mostraram que a cinética de ligação, o espectro e o enovelamento da “mini-mioglobina” é muito semelhante ao da mioglobina nativa ⁴⁷. Sendo assim, acredita-se que as espécies formadas são espécies similares à “mini-mioglobina.

Considerando-se os espectros de massas e a proposta de formação da espécie “mini-mioglobina” utilizou-se o software *Peptide Cutter* (*Expasy*) para realizar a predição da estrutura primária dos polipeptídios obtidos. Um polipeptídio de MM 13,8 kDa é obtido pela deleção dos resíduos de aminoácidos 1-29 e um de MM de 13,5 kDa é formado tanto pela deleção dos resíduos de aminoácidos de 1-31 quanto de 1-32. As predições de estrutura primária estão mostradas na Figura 26.

Figura 26 – Predição da estrutura primária dos polipeptídios obtidos pela digestão da mioglobina utilizando-se o programa *Peptide Cutter* (http://web.expasy.org/peptide_cutter). **A)** Estrutura primária mioglobina nativa (1-153); **B)** Estrutura primária obtida pela deleção dos resíduos 1-29, formando um polipeptídio de massa 13,8 kDa (30-153); **C)** Estrutura primária obtida pela deleção dos resíduos 1-31, formando um polipeptídio de massa 13,5 kDa (32-153). **D)** Estrutura primária obtida pela deleção dos resíduos 1-32, formando um polipeptídio de massa 13,5 kDa (33-153).

Levando-se em consideração a estrutura primária predita para o peptídeo majoritário (13,8 kDa), e a partir da modelagem por homologia com a mioglobina nativa, utilizando-se o software *Phyre*², obteve-se a estrutura tridimensional da mioglobina digerida, conforme mostrado na Figura 27.

Figura 27 – Estrutura tridimensional da mioglobina, digerida por 5 minutos com pepsina, obtida a partir da modelagem por homologia utilizando-se o software *Phyre*² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Em comparação com a mioglobina nativa é visto que a mioglobina parcialmente digerida apresenta um canal que facilita o acesso da BsEFCH ao grupo heme, esse canal pode propiciar um caminho para acelerar a reação de transmetalção com base na interação proteína-proteína entre o fragmento da globina da mioglobina e a BsFECH.

5 CONCLUSÃO

A BsFECH foi produzida enovelada, com alto grau de pureza, sendo construída tanto por folhas β quanto por α -hélices. Apresenta estrutura terciária local, se comporta como um monômero assimétrico em solução e o aumento da concentração de sal no meio aumenta a estabilidade da proteína frente aos agentes desnaturantes ureia e temperatura. A BsFECH produzida é capaz de ligar-se ao substrato modelo solúvel em água, TPPS, conforme verificado por espectroscopia de UV-Vis e é capaz de associar-se à metamioglobina através da reação de cross-linking com DSS, conforme observado por SDS-PAGE. Estudos cinéticos, utilizando-se a TPPS, mostraram um aumento significativo na taxa de inserção de Zn(II) na TPPS na presença da enzima, esse aumento é baseado na distorção do anel da porfirina através da ligação da enzima facilitando a inserção dos íons de zinco. A reação de transmetalção catalisada pela BsFECH é facilitada pela proteólise limitada da mioglobina com pepsina uma vez que a mioglobina parcialmente digerida apresenta um canal que facilita o acesso da BsFECH ao grupo heme, podendo assim, facilitar a reação de transmetalção. Portanto, a reação transmetalção, catalisada pela FECH, importante para a formação da ZnPP durante os longos períodos de maturação do presunto parma, parece depender principalmente de dois fatores: i) da proteólise limitada da mioglobina, seguida pela ii) distorção do anel da protoporfirina causada pela FECH.

REFERÊNCIAS

- 1 SINDELAR, J.; MILKOWSKI, A. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/Benefit of Its Use. **AMSA White Paper Series**, número 3, novembro 2011.
- 2 YOUSSEF, E. Y.; GARCIA, C. E. R.; SHIMOKOMAKI, M. Effect of salt on color and warmed over flavor in charqui meat processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 595-600, 2003.
- 3 ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; GERRARD, D. E.; MILLS, E. W. **Principles of Meat Science**. 4^o edição, Dubuque: Kendall/Hunt Publishing, 2002. cap. 7, p. 122-126.
- 4 LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p181-186, 2000.
- 5 SOBRINHO, A. G. S.; ZEOLA, N. M. B. L.; SOUZA, H. B. A.; LIMA, T. M. A. Qualidade da carne ovina submetida ao processo de salga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 369-372, 2004.
- 6 YOUSSEF, E. Y.; GARCIA, C. E. R.; FIGUEIREDO, B.; SHIMOKOMAKI, M. Níveis residuais de sais de cura e seu efeito antioxidante em jerked beef. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 645-650, 2011.
- 7 TORRES, E.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I.; KU, P. K. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). **Food Chemistry**, v. 32, p. 257-268, 1989.
- 8 MØLLER, J. K. S.; JENSEN, J. S.; SKIBSTED, L. H.; KNÖCHEL, S. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model system and smoked, fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* (IOF0956 and JM1173) and commercial starter cultures. **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 6, p. 463-469, 2003.
- 9 PEGG, R. B.; SHAHIDI, F. Unraveling the chemical identity of meat pigments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n. 6, p. 567-589, 1997.
- 10 BECKER, E. M.; WESTERMANN, S.; HANSSON, M.; SKIBSTED, L. H. Parallel enzymatic and non-enzymatic formation of zinc protoporphyrin IX in pork. **Food Chemistry**, v.130, p. 832–840, 2012.
- 11 SUMAN, S. O.; JOSEPH, P. Myoglobin chemistry and meat color. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 79-99, 2013.
- 12 MØLLER, J. K. S. **Myoglobins & nitric oxide**. 2002. 105 f. Tese (Pós-Doutorado) –Departament of Dairy and Food Science - Section for Food Chemistry – The Royal Veterinary and Agricultural University, Dinamarca, 2002.

- 13: LIBARDI, S. H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato intestinal**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
- 14 DAMORADAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. 4º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- 15 MANCINI, R. A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, p. 100-121, 2005.
- 16 MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Color. In: TOLDRÁ, F. **Handbook of fermented meat and poultry**. Chichester: John Wiley, 2008. cap.23, p. 203-216.
- 17 SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 176-183, 2011.
- 18 KILLDAY, K.B.; TEMPESTS, M. S.; BAILEY, M. E.; METRAL J. M. Structural Characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: Implications into the Meat Curing Reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n.5, 1988.
- 19 MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Reviews**, v.102, p.1167-1178, 2002.
- 20 MØLLER, J. K. S.; ADAMSEN, C. E.; CATHARINO, R. R.; SKIBSTED, L. H.; EBERLIN M.N. Mass spectrometric evidence for a zinc-porphyrin complex as the red pigment in dry-cured Iberian and Parma ham. **Meat Science**, v.75, p.203-210, 2007.
- 21 WAKAMATSU, J.; NISHIMURA, T.; HATTORI, A. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. **Meat Science**, v.67, p.95–100, 2004.
- 22 ADAMSEN, C. E.; MØLLER, J. K. S.; PAROLARI, G.; GABBA, L.; SKIBSTED, L. H. Changes in Zn-porphyrin and proteinous pigments in italian dry-cured ham during processing and maturation. **Meat Science**, v.74, p.373-379, 2006.
- 23 WAKAMATSU, J.; ITO, T.; NISHIMURA, T.; HATTORI, A. Direct demonstration of the presence of zinc in the acetone-extractable red pigment from Parma ham. **Meat Science**, v.76, p.385–387, 2007.
- 24 MØLLER, J. K.S.; ADAMSEN, C. E.; CATHARINO, R. R.; SKIBSTED, L. H.; EBERLIN, M. N. Mass spectrometric evidence for a zinc-porphyrin complex as the red pigment in dry-cured Iberian and Parma ham. **Meat Science**, v. 75, p. 203–210, 2007.
- 25 GROSSI, A. B.; NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; SKIBSTED, L. H. Proteolysis involvement in zinc-protoporphyrin IX formation during Parma ham maturation. **Food Research International**, v. 56, p. 252-259, 2014.

- 26 HUNTER, G. A.; AL-KARADAGHI, S.; FERREIRA, G. C. Ferrochelatase: the convergence of the porphyrin biosynthesis and iron transport pathways. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 15, p. 350–356, 2011.
- 27 LECEROF, D.; FODJE, M. N.; LEÓN, R. A.; OLSSON, U.; HANSSON, A.; SIGFRIDSSON, E.; RYDE, U.; HANSSON, M.; AL-KARADAGHI, S. Metal binding to *Bacillus subtilis* ferrochelatase and interaction between metal sites. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, p. 452-458, 2003.
- 28 HANSSON, M. D.; LINDSTAM, M. Crosstalk between metal ions in *Bacillus subtilis* ferrochelatase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, p. 325–333, 2006.
- 29 FERREIRA, G. C. Ferrochelatase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.31, p. 995-1000, 1999.
- 30 MEDLOCK, A. E.; DAILEY, T. A.; ROSS, T. A.; DAILEY, H. A.; LANZILOTTA, W. N. A π -helix switch selective for porphyrin deprotonation and product release in human ferrochelatase. **Journal of Molecular Biology**, v.373, p.1006-1016, 2007.
- 31 AL-KARADAGHI, S.; HANSSON, M.; NIKONOV, S.; JÖNSSON, B.; HEDERSTEDT, L. Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis. **Structure**, v. 5, n. 11, p. 1501–1510, 1997.
- 32 DAILEY, H. A.; DAILEY, T. A.; WU, C.-K.; MEDLOCK, A. E.; WANG, K.-F.; ROSE, J. P.; WANG, B.-C. Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p.1909-1926, 2000.
- 33 WU, C.-K.; DAILEY, H. A.; ROSE, J. P.; BURDEN, A.; SELLERS, V. M.; WANG, B.-C. The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 2, p.156-160, 2001.
- 34 DAILEY, H. A.; FINNEGAN, M. G.; JOHNSON, M. K. Human ferrochelatase is an iron-sulfur proteid. **Biochemistry**, v. 33, p. 403-407, 1994
- 35 CHAU, T. T.; ISHIGAKI, M.; KATAOKA, T.; TAKETANI, S. Ferrochelatase catalyzes the formation of Zn-protoporphyrin of dry-cured ham via the conversion reaction from heme in meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12238–12245, 2011.
- 36 TAKETANI, S.; ISHIGAKI, M.; MIZUTANI, A.; UEBAYASHI, M.; NUMATA, M.; OHGARI, Y.; KITAJIMA, S. Heme synthase (ferrochelatase) catalyzes the removal of iron from heme and demetalation of metalloporphyrins. **Biochemistry**, v.46, p. 15054-15061, 2007.
- 37 HANSSON, M. D.; KARLBERG, T.; RAHARDJA, M. A.; AL-KARADAGHI, S.; HANSSON, M. Amino acid residues His183 and Glu264 in *Bacillus subtilis* ferrochelatase direct and facilitate the insertion of metal ion into protoporphyrin IX. **Biochemistry**, v.46, p.87-94, 2007.

- 38 PACE, C.N.; GRIMSLEY, G.R.; SCHOLTZ, M. Denaturation of proteins by urea and guanidine hydrochloride. In: BUCHNER, J.; KIEFHABER, T. **Protein folding handbook**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p.45-69
- 39 EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948-1954, 1967.
- 40 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2876-2890, 2006.
- 41 CHENPRAKHON, P.; SUCHARITAKU, J.; PANIJPAN, B.; CHAIYEN, P. Measuring binding affinity of protein-ligand interaction using spectrophotometry: binding of neutral red to riboflavin-binding protein. **Journal of Chemical Education**, v. 87, n.8, p.829-831, 2010.
- 42 WILKINS R. G. **The study of kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes**. Boston: Allyn and Bacon, 1974. p. 25-31.
- 43 KELLEY L. A.; STERNBERG M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n.3, p.363-371, 2009.
- 44 ZERAIK, A. E. **Caracterização estrutural e funcional de septinas de *Schistosoma mansoni***. 2013. 161 f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Física Aplicada Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.
- 45 SCHWARZINGER, S.; AHRER, W.; MÜLLER, N. Proteolytic preparation of heme binding fragment from sperm whale myoglobin: micro-myoglobin. **Monatshefte für Chemie**, v. 131, p.409-416, 2000.
- 46 GIARDINA, B.; ASCOLI, F.; BRUNORI, N. Mini-myoglobin the structural significance of haem-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 200, p.725-733, 1988.
- 47 SANCTIS, G.; FALCIONI, G.; GRELLONI, F.; DESIDEN, A.; POLIZIO, F.; GIARDINA, B.; ASCOLI, F.; BRUNORI, M. Mini-myoglobin: Electron paramagnetic resonance and reversible oxygenation of the cobalt derivative. **Journal of Molecular Biology**, v. 222, p.637-643, 1991.