

Elogio da Desnitrificação

>

Isabel Moura*
Sofia R. Pauleta
Marta S. P. Carepo

Cristina M. Cordas
Luísa B. Maia
José J. G. Moura

Praise of Denitrification. *Denitrification is one of the main pathways in the nitrogen biogeochemical cycle, allowing nitrates and nitrites to be used as final acceptors for anaerobic respiration. This pathway comprises four consecutive oxygen abstraction reactions that are catalyzed by four different metalloenzymes, which have catalytic centers containing Mo, Cu and Fe. This metabolic pathway has been extensively studied by biochemists from a structural and functional point of view, with emphasis on the metal active centers of these enzymes, as well as by bioinorganic chemists who have synthesized model compounds of these active centers. The structures of these enzymes have been solved, and unique metal centers have been revealed, such as the “CuZ” center. The application of spectroscopic, bioelectrochemical and biophysical techniques, and kinetic studies have enabled the identification of some of the catalytic intermediates, and to obtain structural information on the electron transfer complexes and the stability of these enzymes. Despite these advances, some questions remain unanswered, and the study of this pathway continues to be fundamental for controlling both greenhouse gas emissions and excess nitrates in the soil, water, and air.*

A desnitrificação é uma das principais vias do ciclo biogeoquímico do nitrogénio, permitindo a utilização de nitratos e nitritos como aceitadores finais da respiração anaeróbia. Esta via é composta por quatro reações consecutivas, de abstração de átomos de oxigénio, que são catalisadas por quatro metaloenzimas diferentes, que apresentam centros catalíticos contendo Mo, Cu e Fe. Esta via metabólica tem sido amplamente estudada por bioquímicos do ponto de vista estrutural e funcional, com destaque para os centros ativos metálicos das enzimas, bem como por químicos bioinorgânicos que sintetizaram diversos compostos modelo destes centros ativos. As estruturas destas enzimas foram sendo resolvidas, e centros metálicos únicos foram sendo revelados, como o centro “CuZ”. A aplicação de técnicas espectroscópicas, bioeletroquímicas, biofísicas e estudos cinéticos permitiram identificar alguns dos intermediários catalíticos, e obter informação estrutural sobre os complexos de transferência eletrónica e a estabilidade destas enzimas. Apesar dos avanços, algumas questões mantêm-se sem resposta, e o estudo desta via continua a ser fundamental quer para o controlo da emissão de gases com efeito de estufa quer para controlar o excesso de nitratos no solo, na água e no ar.

1. Introdução

Este artigo está inserido num número especial do *QUÍMICA* - Boletim da SPQ, que recolhe artigos dedicados à memória do Professor J. J. R. Fraústo da Silva, em complemento à sessão que ocorreu no Encontro Anual da SPQ, Aveiro 2023, à criação do Prémio Fraústo da Silva (SPQ) atribuído pela primeira vez este ano ao Professor Carlos F. G. C. Geraldes. No “Elogio à Desnitrificação” procurámos enaltecer os aspetos do papel dos metais em reações que conduzem às quatro etapas de transformação sucessiva de nitrato a nitrogénio molecular e à fundação da Química Bioinorgânica que muito deve ao espírito científico inovador do Professor Fraústo da Silva.

A desnitrificação é uma das vias metabólicas do ciclo do nitrogénio em que os nitratos no solo ou na água são convertidos por microrganismos em nitrogénio molecular

(N_2) (Figura 1A). Este processo é relevante para o ciclo do nitrogénio, pois remove o excesso de nitrogénio do meio ambiente que é devolvido à atmosfera.

A desnitrificação é um processo biológico sequencial no qual os óxidos de nitrogénio (NO_x) são reduzidos a N_2 na ausência de oxigénio, num processo energético em que se gera um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna, que está associado à síntese de ATP (Figura 1B). As enzimas envolvidas neste processo são a redutase do nitrato, a redutase do nitrito, a redutase do óxido nítrico e, finalmente, a redutase do óxido nítrico. Essas enzimas trabalham em conjunto e sequencialmente reduzindo o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), depois a óxido nítrico (NO), a N_2O e, finalmente, a N_2 (Figura 1B) [1].

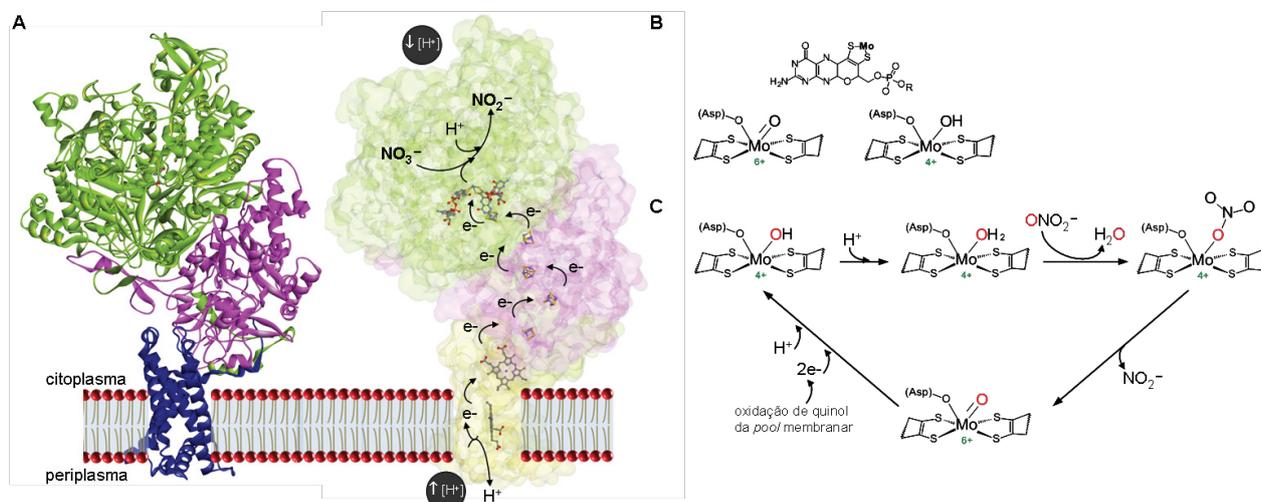
lateral de um resíduo de aspartato (Figura 2B). Os elétrons necessários à redução do nitrato (Eq. 1) são transferidos, intramolecularmente, do quinol localizado na membrana citoplasmática, através dos três centros [4Fe-4S] e um [3Fe-4S] presentes na subunidade citoplasmática NaRH e de dois hemos do tipo-*b* presentes na subunidade transmembranar NaRI (Figura 2A).

De um modo muito simplificado, a catálise da redução de nitrato a nitrito inicia-se com o centro ativo de molibdênio reduzido (Figura 2C) [6]. Neste estado, de Mo^{4+} , o grupo oxido coordenado ao metal encontra-se protonado ($\text{Mo}^{4+}\text{-OH}$) e pode ser facilmente convertido num bom grupo de saída (uma molécula de água) após uma segunda protonação. A ligação do nitrato ao molibdênio desloca a molécula de água, formando-se o intermediário covalente $\text{Mo}^{4+}\text{-O-NO}_2$. A subsequente lise da ligação O-N liberta o produto, nitrito, e resulta na oxidação do metal ($\text{Mo}^{6+}=\text{O}$). O centro ativo é posteriormente regenerado através da redução do molibdênio por dois elétrons provenientes da oxidação do parceiro fisiológico da enzima; neste caso, a fonte de elétrons é o quinol membranar.

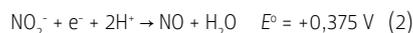
3. Redutase do nitrito

As redutases do nitrito (NiRs) são enzimas contendo centros de cobre ou centros hémicos que catalisam o segundo passo da desnitrificação, a redução de nitrito

Figura 2 - Redutase do nitrato. A) Redutase do nitrato NaRGHl. Apenas um heterotrímero da unidade ($\alpha\beta\gamma$), está representado; na representação da esquerda, mostra-se a organização estrutural das subunidades NaRG, NaRH e NaRI, representadas a verde, violeta e azul, respetivamente; na representação da direita destacam-se o arranjo dos cofatores e o fluxo de elétrons e prótons, estando o carbono, o nitrogénio, o oxigénio, o fosfato, o enxofre, o ferro e o molibdénio representados a cinzento, azul, vermelho, laranja, dourado, azul escuro e azul esverdeado, respetivamente (coordenadas usadas PDB 1R27 da NaRGHl de *Escherichia coli*). B) Estrutura do cofator de piranopterina (em cima) e do centro da NaRGHl nas formas oxidada (Mo^{6+}) e reduzida (Mo^{4+}). Nestes dois últimos, está representado apenas o pseudo-anel ditioleto que coordena o molibdénio; R representa monofosfato de guanosina. C) Mecanismo reacional de redução de nitrato a nitrito. O átomo de oxigénio abstraído da molécula de nitrato está destacado a vermelho.



(NO_2^-) a óxido nítrico (NO) [8], de acordo com a Eq. (2):



As enzimas contendo centros hémicos, designadas de cd_1NiRs e codificadas pelo gene *nirS*, são homodímeros periplasmáticos, em que cada monómero liga um hemo do tipo- d_1 e um hemo do tipo- c em dois domínios estruturalmente diferentes (Figura 3A) [9,10], sendo o primeiro o local catalítico e o segundo responsável pela aceitação de elétrons de pequenas proteínas redox, tais como citocromos *c* ou cupredoxinas, e pela sua transferência para o centro ativo [11,12].

As cd_1NiRs são isoladas na sua forma inativa, uma vez que a esfera de coordenação do ferro do hemo d_1 está completamente ocupada, tendo como ligandos axiais as cadeias laterais de uma histidina e de uma tirosina [13,14]. No entanto, após a ativação, que consiste na redução do hemo do tipo- c , ocorrem modificações conformacionais que alteram a sua esfera de coordenação, passando de uma coordenação bis-His hexacoordenada para Met/His, e concomitantemente o íon ferro do hemo do tipo- d_1 perde a coordenação axial da tirosina, ficando com um local de coordenação vago para o substrato se ligar (Figura 3B) [9,13,14]. Estudos mecanísticos mostraram que a atividade ótima desta enzima ocorre a pH 6,5, e que a libertação de NO do hemo d_1 reduzido é muito rápida, não permitindo a formação do aduto $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ [9,15,16].

As redutases do nitrito dependentes de cobre, designadas de CuNiRs e codificadas pelo gene *nirK*, têm dois centros de cobre com funções semelhantes ao hemo *c* e d_1 [17]. Assim, os elétrons doados por pequenas proteínas redox são transferidos para o centro de cobre do tipo 1 (CuT1) e depois para o centro de cobre do tipo 2 (CuT2), que é o centro ativo da enzima [18], onde o nitrito é reduzido a NO [19–22]. Nos últimos anos, com os avanços na sequenciação de genomas, foi demonstrado que o domínio conservado das CuNiRs está associado a domínios adicionais no N- ou C-terminal.

Estes domínios adicionais ligam hemo do tipo-c ou centros CuT1 e medeiam a transferência de elétrons para o domínio conservado [23].

O domínio conservado nas várias famílias de CuNiR tem uma estrutura homotrimérica (Figura 3C), com cada subunidade contendo os dois centros mononucleares de cobre [17,24]. O centro CuT1 é coordenado por dois resíduos de histidina, uma metionina e uma cisteína, da mesma subunidade. Por sua vez, o centro CuT2 está localizado na interface entre dois monômeros e é coordenado por três cadeias laterais de histidina, uma das quais é do monômero adjacente (Figura 3D) [25]. Estes dois centros estão ligados entre si por uma ponte de cisteína-histidina conservada que consiste na cisteína que coordena o centro CuT1 e na histidina que coordena o centro CuT2 [17,23,24].

O Asp97 e a His240, dois resíduos conservados presentes no centro catalítico (numeração de acordo com a estrutura da CuNiR de *Alcaligenes faecalis*, Figura 3D), foram identificados como sendo importantes para a catálise [26–28]. Estes resíduos, ligados por pontes de hidrogênio a uma molécula de água, estão envolvidos na formação da espécie intermediária $T2Cu^+-NO_2^-$, desencadeando a transferência de elétrons através da ponte cisteína-histidina, e atuando assim como uma “via de detecção do substrato” [29–31].

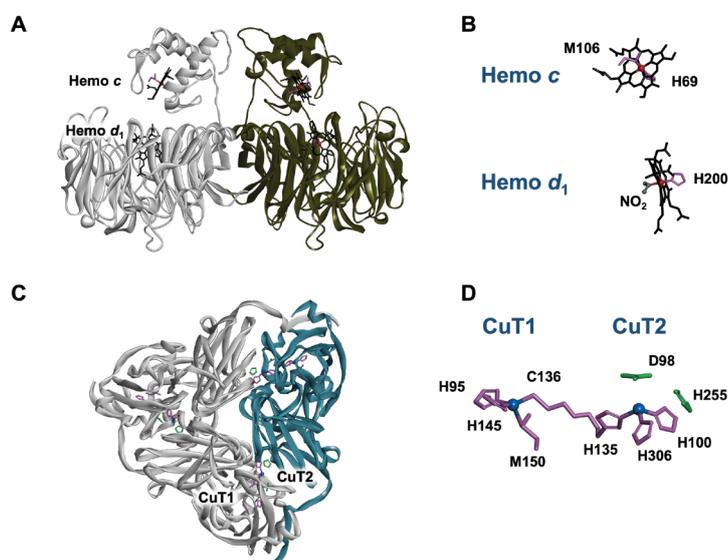


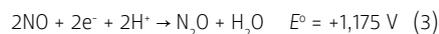
Figura 3 - Redutase do nitrito. Estrutura da *cdNiR* de *Paracoccus denitrificans* no estado ativo (A), em que se observa que o hemo *c* está Met/His-coordenado, enquanto o hemo *d*₁ é coordenado por uma histidina, e pelo nitrito. Estrutura da CuNiR de *Alcaligenes faecalis* mostrando a sua estrutura homotrimérica, e a coordenação dos seus centros de cobre (D). As figuras foram preparadas com o

Biovia Discovery Studio com as coordenadas 1AOF e 1AOM (painel A e B, respetivamente) e 1AS7 (painel C e D), usando o seguinte esquema de cores: Cu (azul), Fe (vermelho), hemo (preto), resíduos que coordenam os centros CuT1, CuT2 e o ferro hémico (rosa), resíduos Asp e His do centro ativo (verde).

4. Redutase do óxido nítrico

A redutase do óxido nítrico (NOR) é a enzima que, no processo da desnitrificação, catalisa a redução de óxido nítrico a óxido nitroso. A reação (Eq. 3) envolve dois elétrons e dois prótons, e promove a formação

da ligação N–N, fundamental para chegar à última espécie do ciclo, o gás N_2 .



De entre as redutases do óxido nítrico que se podem encontrar em bactérias e arqueias, existem três tipos de enzimas que diferem no tipo de centros e subunidades, nomeadamente a cNOR, a qNOR e a qCuNOR [32,33].

A cNOR é uma proteína membrana composta por duas subunidades, designadas por NorC (17 kDa) e NorB (54 kDa), contendo, respetivamente, um hemo do tipo-*c*, e dois outros centros metálicos, nomeadamente um hemo do tipo-*b* e um centro bimetalico, em que um outro hemo do tipo-*b* (hemo b_3) está acoplado, através de uma ligação do tipo ponte oxo, a um ferro não-hémico (Fe_B), $Fe-O-Fe_B$. Este centro bimetalico composto pelo hemo b_3-Fe_B é o centro ativo desta enzima [34], possuindo grande homologia com o centro da superfamília das oxidases de cobre-hémicas (HCuO), à qual a NOR pertence. Contudo, na cNOR, o centro catalítico bimetalico é composto por dois iões ferro em vez do centro misto de Fe/Cu das HCuO.

Uma propriedade particular da cNOR, demonstrada *in vitro*, é a sua capacidade de catalisar, para além da redução do NO, também a redução do oxigénio, tal como as suas homólogas da superfamília HCuO [35]. Os dadores de elétrons são pequenas proteínas redox, citocromos do tipo-*c* ou cupredoxinas. No caso de *M. nauticus* foi possível identificar o provável doador de elétrons fisiológico como sendo o citocromo c_{552} [36]. Os elétrons são transferidos para a enzima através da subunidade NorC (subunidade responsável pela aceitação de elétrons), sendo depois transferidos para a subunidade NorB onde ocorrem as reações de redução dos substratos (subunidade catalítica). Através da comparação entre a interação entre o citocromo c_{552} e a cNOR versus citocromo c_{552} e a subunidade NorC (expressa individualmente) foi possível verificar que apenas quando a subunidade NorB está presente, ou seja, com a enzima cNOR completa, a transferência de elétrons ocorre (do citocromo c_{552} para a enzima cNOR), provando a elevada especificidade desta interação e o papel modelador da subunidade NorB [37].

De entre as enzimas da via da desnitrificação, a NOR foi a última para a qual a estrutura cristalográfica foi resolvida. Em 2010, a estrutura de uma cNOR foi resolvida por Hino *et al.* [38], e dois anos mais tarde foi obtida a estrutura da qNOR por Y. Shiro [39].

A qNOR possui uma sequência primária semelhante à cNOR, mas não tem subunidades. Contém dois centros metálicos semelhantes à subunidade NorB da cNOR, incluindo o centro catalítico bimetalico, mas não possui a subunidade NorC, recebendo elétrons através de hidroquinonas no meio. Esta enzima encontra-se muitas vezes expressa em organismos patogénicos, e por vezes sem estar acompanhada pelas restantes enzimas

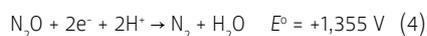
da via da desnitrificação.

A qCuNOR assemelha-se à cNOR por possuir também duas subunidades, sendo uma delas semelhante à NorB da cNOR. Na subunidade menor, em vez de um hemo do tipo-c, encontra-se um centro de cobre do tipo CuA (semelhante ao presente na oxidase do citocromo c e na redutase do óxido nítrico), constituído por uma ligação bimetalica entre dois iões cobre, que tipicamente é descrito como sendo um centro de transferência eletrónica (ver Figura 5C) [32,40]. Os dados de elétrons desta enzima são citocromos do tipo-c e menaquinona.

O mecanismo catalítico da redução do NO tem sido continuamente debatido, com o foco na ligação do NO ao centro bimetalico Fe hémico-Fe_b. Dois mecanismos principais têm sido discutidos, o denominado “cis” em que duas moléculas de NO se ligam ao Fe_b ou ao ferro do hemo b₃, e o mecanismo “trans”, em que uma molécula de NO se liga ao Fe_b e outra ao Fe hémico [32,36,37]. Todos os mecanismos concordam, contudo, com a formação do ião hiponitrito como um intermediário da reação. A caracterização eletroquímica dos centros e da atividade catalítica foi importante, não só para abrir perspectivas da utilização destas enzimas em aplicações reais (como por exemplo sensores [41]) mas também para clarificar alguns aspetos do seu mecanismo catalítico. Os dados eletroquímicos obtidos sob várias condições apontam o mecanismo cis-Fe_b como sendo o mais provável [35,36,42]. Contudo, a discussão mecanística permanece, pois estudos computacionais mais recentes favorecem, pelo menos teoricamente, uma via semelhante à cis-hemo b₃ em que o NO se liga ao Fe hémico seguido de uma série de passos em que a segunda molécula de NO se liga no mesmo centro a um intermediário Fe-NO-O, estabilizado pela ligação dos dois oxigénios ao Fe_b [43]. Os estudos eletroquímicos efetuados revelaram também ser possível controlar a atividade catalítica através da imposição de potencial [35,36,42].

5. Redutase do óxido nítrico

A redutase do óxido nítrico (N₂OR) catalisa a redução do N₂O a nitrogénio molecular de acordo com a Eq. 4.



Esta reação é a última etapa da desnitrificação [10]. A energia livre global para esta reação é favorável ($\Delta G^\circ = -339,5 \text{ kJ/mol}$) [2,10], mas tem uma energia de ativação elevada (~ 250 kJ/mol) [44]. A elevada energia de ativação é ultrapassada pelo facto da catálise ocorrer num centro metálico especial, o centro “CuZ”, um centro tetranuclear de cobre e enxofre único na natureza.

A N₂OR é codificada no genoma pelo gene *nosZ*. A análise comparativa das sequências genómicas que codificam a N₂OR levou à divisão destes organismos em duas classes de acordo com a composição genética do operão *nosZ*. As N₂ORs pertencentes à classe I têm

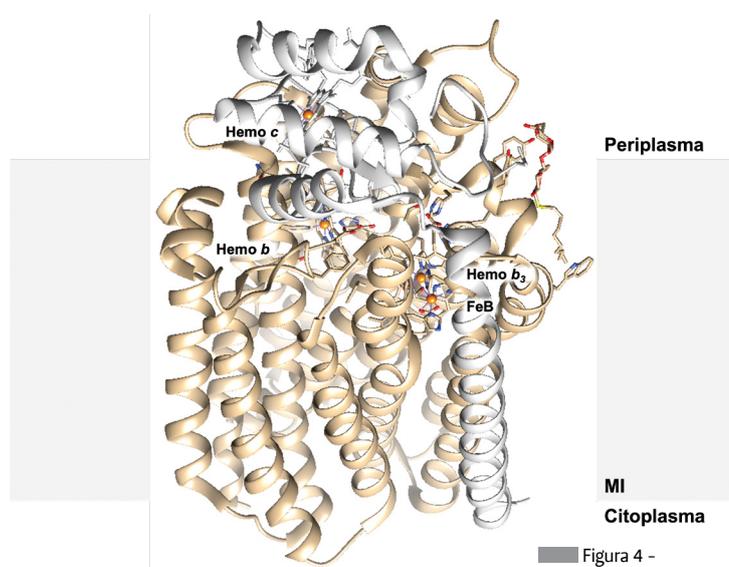


Figura 4 - Redutase do óxido nítrico. Representação da estrutura da cNOR de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3WFC). A cinzento e amarelo estão representadas as subunidades NorC e NorB, respetivamente. MI - membrana interna.

seido isoladas de diferentes proteobactérias [45], que também apresentam genes que codificam para outras enzimas da via da desnitrificação. Estas enzimas têm sido extensivamente estudadas por uma série de técnicas espectroscópicas, cinéticas, estruturais e mecanísticas [46-49]. A N₂OR da classe II foi isolada de *Wolinella succinogenes* [50,51] e foi demonstrado que esta enzima liga um hemo do tipo-c num domínio adicional no C-terminal. Esta característica é única para a enzima isolada desta bactéria, não tendo sido observado nas outras enzimas desta classe. Contrariamente à classe I, ainda não se conhece a estrutura de nenhuma das enzimas da classe II.

As N₂ORs mais estudadas são as isoladas de *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* e *M. nauticus*. Estas enzimas são homodiméricas (com monómeros com disposição antiparalela, Figura 5A), periplasmáticas (Figura 1B) e ligam seis átomos de cobre por monómero, dispostos em dois centros: um centro binuclear, CuA, que é o centro de transferência eletrónica e um centro tetranuclear de cobre, e “CuZ”, o centro ativo, onde a molécula de N₂O se liga e onde ocorre a sua redução.

A análise da estrutura primária em conjunto com a estrutura resolvida por difração de raios-X de *P. denitrificans* mostra que os dois centros se encontram em dois domínios diferentes da enzima: (i) o domínio N-terminal com uma estrutura em ‘β-propeller’ formada por sete lâminas de folhas-β dispostas simetricamente, no centro da qual o centro “CuZ” está inserido (Figura 5A e 5B); e (ii) o domínio C-terminal com uma estrutura em barril-β, que liga o centro CuA na região entre as folhas β8 e β9 do barril (Figura 5A e 5B) [47]. Os dois centros num monómero estão a uma distância de 40 Å, mas a 10 Å se considerarmos os dois monómeros na sua disposição antiparalela. Este arranjo estrutural da N₂OR faz com que o dímero seja um dímero funcional, uma vez que a transferência eletrónica tem de ocorrer entre os dois centros de diferentes monómeros (Figura 5A).

O centro CuA, como referido anteriormente, é muito semelhante ao centro de cobre presente na oxidase do citocromo c [52] e na qCuNOR [53]. O CuA é um centro binuclear de cobre com duas cisteínas em ponte que ligam os dois átomos de cobre através do S γ , sendo os outros ligandos, dois átomos de N $^{\epsilon 2}$ do anel imidazol de duas histidinas, o átomo S $^{\beta}$ de uma metionina e o carbonilo de um grupo triptofano (Figura 5C).

O centro catalítico “CuZ” foi identificado pela primeira vez como sendo um centro tetranuclear de cobre na enzima de *M. nauticus* e de *P. denitrificans* [46-48]. A sua nuclearidade levaria a prever cinco possíveis estados de oxidação para este centro, mas só foram observados três deles: [2Cu $^{2+}$:2Cu $^{1+}$], [1Cu $^{2+}$:3Cu $^{1+}$] e [4Cu $^{1+}$]. Os dois primeiros estados de oxidação foram identificados em N $_2$ OR purificadas, enquanto o último só pode ser atingido *in vitro* através de uma incubação prolongada com viologéneos reduzidos. Para além disso, o centro “CuZ” foi observado em duas formas diferentes, CuZ*(4Cu1S) e CuZ(4Cu2S) (Figura 5D e 5E), que têm diferentes esferas de coordenação, assim como diferentes propriedades espectroscópicas, redox e cinéticas [2]. É importante mencionar que não foi ainda possível isolar a N $_2$ OR a 100% com o centro CuZ(4Cu2S), sendo a conversão entre as duas formas objeto de discussão e de estudo no nosso grupo.

O CuZ*(4Cu1S) é um centro tetranuclear com o enxofre em ponte entre os quatro átomos de cobre (ligação μ_4 com os átomos de cobre), adotando uma geometria tetraédrica distorcida. O Cu $_1$, Cu $_2$ e Cu $_3$ são coordenados por duas histidinas, enquanto o Cu $_4$ é coordenado por uma só histidina. Estes átomos de cobre são coordenados quer pelo N $^{\epsilon 2}$ ou N $^{\epsilon 1}$ do anel de imidazol e há também um átomo de oxigénio que faz uma ligação em ponte entre o Cu $_1$ e o Cu $_4$ [46-49] (Figura 5D). A estrutura do CuZ(4Cu2S) no estado de oxidação [2Cu $^{2+}$:2Cu $^{1+}$] foi obtida para a N $_2$ OR de *P. stutzeri* [49], e mostrou que existe um outro átomo de enxofre fazendo a ponte entre o Cu $_1$ e o Cu $_4$ na posição ocupada pelo átomo de oxigénio no CuZ*(4Cu1S) [49] (Figura 5E). Pensa-se que o local de ligação do substrato será entre o Cu $_1$ e o Cu $_2$, necessitando a enzima de estar na sua forma completamente reduzida [54].

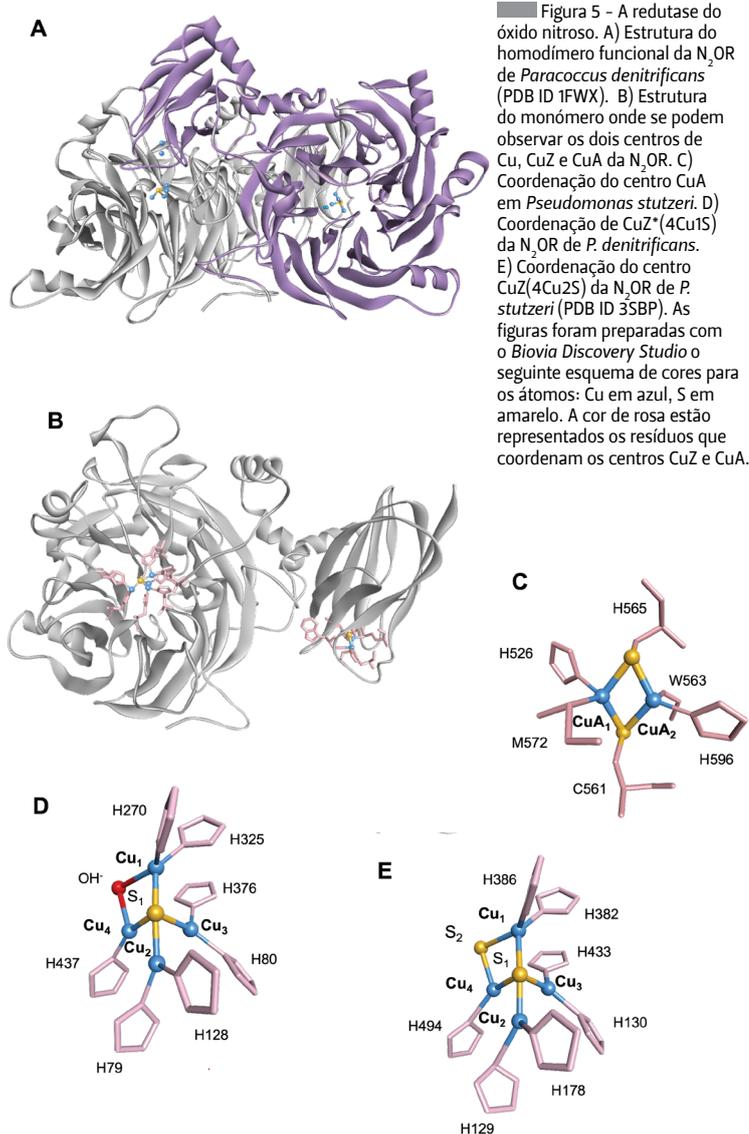
Estudos realizados por eletroquímica demonstraram que há um mecanismo concertado próton-eletrão que controla o potencial de redução do CuA [55]. O potencial de redução do CuA em amostras de enzima com CuZ*(4Cu1S) é controlado pela protonação da histidina coordenante num processo que envolve dois prótons acoplados à transferência eletrónica.

O grupo de investigação liderado por O. Einsle desenvolveu um sistema de produção heterólogo em *Escherichia coli*, que inclui os genes acessórios *nosRDFYL*, permitindo a produção de N $_2$ OR funcional [56]. Este sistema permitiu gerar várias variantes desta enzima, alterando os ligandos do centro “CuZ” [57] e também variantes alterando a His583 que coordena o centro CuA [58]. Nas variantes

da N $_2$ OR em que o resíduo His583 foi alterado para Ala, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Phe, Tyr e Trp observou-se que somente aqueles com cadeias laterais protonáveis, como por exemplo His, Asp e Glu, mantinham a capacidade de realizar transferência eletrónica a pH fisiológico.

Relativamente ao ciclo catalítico desta enzima, um dos intermediários foi identificado e caracterizado espectroscopicamente, o CuZ 0 , propondo-se que apresente um grupo hidroxilo ligado ao Cu $_4$. Este intermediário tem atividade catalítica idêntica à enzima com o “CuZ” completamente reduzido [59,60], e somente este valor de atividade catalítica explica a capacidade das células conseguirem reduzir o N $_2$ O *in situ* [61].

Microrganismos que se desenvolvam num meio ácido mostram uma clara diminuição da sua capacidade na redução do N $_2$ O [62], explicando o impacto do decréscimo do pH dos solos e águas, no aumento da concentração atmosférica de N $_2$ O e nas alterações climáticas.



6. Conclusões

O elogio da desnitrificação é uma revisão concisa dos aspetos bioinorgânicos da desnitrificação, com ênfase nas estruturas e mecanismos de metaloenzimas envolvidas nesta via complexa. A desnitrificação é um processo anaeróbico usado por alguns microrganismos para gerar energia através da redução sucessiva de nitrato a nitrogénio molecular (um tipo de “respiração” anaeróbia). Para isso, diferentes metaloenzimas, dependentes de molibdénio, ferro e cobre, catalisam, em sequência, quatro etapas simples: o nitrato é reduzido a nitrito, depois a óxido nítrico, seguido pela redução a óxido nitroso, e por uma redução final a nitrogénio molecular. Um dos aspetos mais interessantes é que, no estado atual de conhecimento, as estruturas destas enzimas são conhecidas com elevada resolução, permitindo considerações mecânicas detalhadas, e por consequência, um possível controle das etapas envolvidas.

O processo global tem implicações ambientais de particular relevância. A acumulação de nitratos e a libertação de óxido nitroso na atmosfera devido ao uso excessivo de fertilizantes na agricultura são dois exemplos de problemas ambientais onde a desnitrificação desempenha um papel central.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos: UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020 do Laboratório Associado de Química Verde – LAQV, UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020 da Unidade de Investigação em Biociências Moleculares Aplicadas – UCIBIO, LA/P/0140/2020 do Laboratório Associado Instituto de Saúde e Bioeconomia – i4HB, JM by PTDC/BTA-BTA/0935/2020 (JJGM), 2022.01152.PTDC (IM), e através do programa de Estímulo ao Emprego Científico Individual CEEC-IND/03810/2017 (LBM).

Referências

- [1] I. Moura, L. B. Maia, S. R. Pauleta, J. J. G. Moura. *A Bird's Eye View of Denitrification in Relation to the Nitrogen Cycle*, in I. Moura, J. J. G. Moura, S. R. Pauleta, L. B. Maia (Eds.), “Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, pp. 1-10. DOI: 10.1039/9781782623762-00001.
- [2] S. R. Pauleta, M. S. P. Carepo, I. Moura, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *387*, 436-449. DOI: 10.1016/j.ccr.2019.02.005.
- [3] P. J. Gonzalez, M. G. Rivas, J. J. G. Moura, *Structure, Function and Mechanisms of Respiratory Nitrate Reductases*, in I. Moura, J. J. G. Moura, S. R. Pauleta, L. B. Maia (eds.), “Metalloenzymes in Denitrification”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, pp. 39-58. DOI: 10.1039/9781782623762-00039.
- [4] F. Blasco, B. Migliarelli, A. Magalon, M. Asso, G. Giordano, R. A. Rothery, *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 179-193. DOI: 10.1007/PL00000846.
- [5] R. Hille, J. Hall, P. Basu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3963-4038. DOI: 10.1021/cr400443z.
- [6] L. B. Maia, I. Moura, J. J. G. Moura. *Molybdenum and Tungsten-Containing Enzymes: An Overview*, in R. Hille, C. Schulzke, M. Kirk (ed.), “Molybdenum and tungsten enzymes: Biochemistry”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, pp. 1-80. DOI: 10.1039/9781782623915-00001.
- [7] A. Magalon, R. R. Mendel, *EcoSal Plus* **2015**, *6*. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013.
- [8] W. G. Zumft, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 533-616. DOI: 10.1128/61.4.533-616.1997.
- [9] S. Rinaldo, G. Giardina, F. Cutruzzolà. *Nitrite Reductase - Cytochrome cd1*, in I. Moura, J. J. G. Moura, S. R. Pauleta, L. B. Maia (eds.), “Metalloenzymes in Denitrification”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, pp. 59-90. DOI: 10.1039/9781782623762-00059.
- [10] W. G. Zumft, P. M. Kroneck, *Adv. Microb. Physiol.* **2007**, *52*, 107-227. DOI: 10.1016/S0065-2911(06)52003-X.
- [11] F. Cutruzzolà, M. Aresé, G. Ranghino, G. van Pouderoyen, G. Canters, M. Brunori, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 353-361. DOI: 10.1016/s0162-0134(01)00390-7.
- [12] I. V. Pearson, M. D. Page, R. J. van Spanning, S. J. Ferguson, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6308-6315. DOI: 10.1128/JB.185.21.6308-6315.2003.
- [13] P. A. Williams, V. Fulop, E. F. Garman, N. F. Saunders, S. J. Ferguson, J. Hajdu, *Nature* **1997**, *389*, 406-412. DOI: 10.1038/38775.
- [14] V. Fulop, J. W. Moir, S. J. Ferguson, J. Hajdu, *Cell* **1995**, *81*, 369-377. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90390-9.
- [15] H. Lopes, S. Besson, I. Moura, J. J. Moura, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 55-62. DOI: 10.1007/s007750000159.
- [16] O. Farver, P. M. Kroneck, W. G. Zumft, I. Pecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 7622-7625. DOI: 10.1073/pnas.0932693100.
- [17] M. Nojiri, *Structure and Function of Copper Nitrite Reductase*, in I. Moura, J. J. G. Moura, S. R. Pauleta, L. B. Maia (eds.), “Metalloenzymes in Denitrification”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, pp. 91-113. DOI: 10.1039/9781782623762-00091.
- [18] E. Libby, B. A. Averill, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1992**, *187*, 1529-1535. DOI: 10.1016/0006-291x(92)90476-2.
- [19] S. Suzuki, T. Kohzuma, Deligeer, K. Yamaguchi, N. Nakamura, S. Shidara, K. Kobayashi, S. Tagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11145-11146. DOI: 10.1021/ja00103a035.
- [20] N. G. Leferink, C. Han, S. V. Antonyuk, D. J. Heyes, S. E. Rigby, M. A. Hough, R. R. Eady, N. S. Scrutton, S. S. Hasnain, *Biochemistry* **2011**, *50*, 4121-4131. DOI: 10.1021/bi200246f.
- [21] Y. Fukuda, K. M. Tse, T. Nakane, T. Nakatsu, M. Suzuki, M. Sugahara, S. Inoue, T. Masuda, F. Yumoto, N. Matsugaki, E. Nango, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, C. Song, T. Hatsu, M. Yabashi, O. Nureki, M. E. P. Murphy, T. Inoue, S. Iwata, E. Mizohata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 2928-2933. DOI: 10.1073/pnas.1517770113.
- [22] L. M. Murphy, F. E. Dodd, F. K. Yousafzai, R. R. Eady, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 859-871. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5253.
- [23] R. R. Eady, S. Samar Hasnain, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *460*, 214463. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214463.
- [24] D. S. Barreiro, R. N. S. Oliveira, S. R. Pauleta, *Biomolecules* **2023**, *13*, 1215. DOI: 10.3390/biom13081215.
- [25] S. Horrell, D. Kekilli, R. W. Strange, M. A. Hough, *Metallomics* **2017**, *9*, 1470-1482. DOI: 10.1039/c7mt00146k.
- [26] M. J. Boulanger, M. E. Murphy, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 1111-1127. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5251.
- [27] M. J. Boulanger, M. Kukimoto, M. Nishiyama, S. Horinouchi, M. E. Murphy, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23957-23964. DOI: 10.1074/jbc.M001859200.
- [28] K. Kataoka, H. Furusawa, K. Takagi, K. Yamaguchi, S. Suzuki, *J. Biochem.* **2000**, *127*, 345-350. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022613.
- [29] F. E. Dodd, J. Van Beeumen, R. R. Eady, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 369-382. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2007.
- [30] S. L. Rose, S. V. Antonyuk, D. Sasaki, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, H. Ago, R. R. Eady, T. Toshi, M. Yamamoto, S. S. Hasnain, *Sci. Adv.* **2021**, *7*. DOI: 10.1126/sciadv.abd8523.
- [31] R. W. Strange, L. M. Murphy, F. E. Dodd, Z. H. Abraham, R. R. Eady, B. E. Smith, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 1001-1009. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2648.
- [32] P. Tavares, A. S. Pereira, J. J. Moura, I. Moura, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 2087-2100. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2006.09.003.
- [33] M. J. Torres, J. Simon, G. Rowley, E. J. Bedmar, D. J. Richardson, A. J. Gates, M. J. Delgado, *Nitrous Oxide Metabolism in Nitrate-Reducing Bacteria*, in “Adv. Microb. Physiol.”, in R. K. Poole (ed.), “Advances in Bacterial Electron Transport Systems and Their Regulation”, Academic Press, **2016**, *68*, pp. 353-432. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2016.02.007.
- [34] C. G. Timoteo, A. S. Pereira, C. E. Martins, S. G. Naik, A. G. Duarte, J. J. Moura, P. Tavares, B. H. Huynh, I. Moura, *Biochemistry* **2011**, *50*, 4251-4262. DOI: 10.1021/bi101605p.
- [35] C. M. Cordas, A. S. Pereira, C. E. Martins, C. G. Timoteo, I. Moura, J. J. Moura, P. Tavares, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1878-1881. DOI: 10.1002/cbic.200600253.
- [36] A. G. Duarte, C. M. Cordas, J. J. Moura, I. Moura, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 375-384. DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.01.001.
- [37] S. Ramos, R. M. Almeida, C. M. Cordas, J. J. G. Moura, S. R. Pauleta, I. Moura, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 402-411. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.001.

- [38] T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, Y. Shiro, *Science* **2010**, 330, 1666-1670. DOI: 10.1126/science.1195591.
- [39] Y. Matsumoto, T. Toshi, A. V. Pisljakov, T. Hino, H. Sugimoto, S. Nagano, Y. Sugita, Y. Shiro, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 238-245. DOI: 10.1038/nsmb.2213.
- [40] P. M. H. Kroneck, M. E. S. Torres, *Cytochrome c Oxidase, CuA Center*, in R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, E. A. Permyakov (Eds.), "Encyclopedia of Metalloproteins", Springer, New York, **2013**, pp. 748-753. DOI: 10.1007/978-1-4614-1533-6_93.
- [41] F. O. Gomes, L. B. Maia, C. Cordas, I. Moura, C. Delerue-Matos, J. J. G. Moura, S. Morais, *Bioelectrochemistry* **2019**, 125, 8-14. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2018.08.005.
- [42] C. M. Cordas, A. G. Duarte, J. J. Moura, I. Moura, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1827, 233-238. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.10.018.
- [43] M. R. A. Blomberg, P. Adelroth, *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, 1858, 884-894. DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.08.005.
- [44] K. Jones, *Nitrogen*, in J. C. Bailar, H. J. Emeléus, R. Nyholm, A. F. Trotman-Dickenson (Eds.), "Comprehensive Inorganic Chemistry", Pergamon Press, Oxford, **1973**, 2, pp. 147-388.
- [45] C. Carreira, S. R. Pauleta, I. Moura, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 177, 423-434. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.007.
- [46] K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. J. Moura, I. Moura, M. Tegoni, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 41133-41136. DOI: 10.1074/jbc.M008617200.
- [47] K. Brown, M. Tegoni, M. Prudencio, A. S. Pereira, S. Besson, J. J. Moura, I. Moura, C. Cambillau, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 191-195. DOI: 10.1038/73288.
- [48] K. Paraskevopoulos, S. V. Antonyuk, R. G. Sawers, R. R. Eady, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **2006**, 362, 55-65. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.064.
- [49] A. Pomowski, W. G. Zumft, P. M. Kroneck, O. Einsle, *Nature* **2011**, 477, 234-237. DOI: 10.1038/nature10332.
- [50] S. Teraguchi, T. C. Hollocher, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 1972-1979. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)94130-X.
- [51] J. Simon, O. Einsle, P. M. Kroneck, W. G. Zumft, *FEBS Lett.* **2004**, 569, 7-12. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.05.060.
- [52] H. Beinert, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 521-532. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00521.x.
- [53] Suharti, H. A. Heering, S. de Vries, *Biochemistry* **2004**, 43, 13487-13495. DOI: 10.1021/bi0488101.
- [54] S. Ghosh, S. I. Gorelsky, P. Chen, I. Cabrito, J. J. Moura, I. Moura, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15708-15709. DOI: 10.1021/ja038344n.
- [55] C. Carreira, M. M. C. dos Santos, S. R. Pauleta, I. Moura, *Bioelectrochemistry* **2020**, 133, 107483. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107483.
- [56] L. Zhang, A. Wust, B. Prasser, C. Muller, O. Einsle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, 116, 12822-12827. DOI: 10.1073/pnas.1903819116.
- [57] L. Zhang, E. Bill, P. M. H. Kroneck, O. Einsle, *Chem. Sci.* **2021**, 12, 3239-3244. DOI: 10.1039/d0sc05204c.
- [58] L. Zhang, E. Bill, P. M. H. Kroneck, O. Einsle, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 830-838. DOI: 10.1021/jacs.0c10057.
- [59] E. M. Johnston, C. Carreira, S. Dell'Acqua, S. G. Dey, S. R. Pauleta, I. Moura, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 4462-4476. DOI: 10.1021/jacs.6b13225.
- [60] S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, P. M. Paes de Sousa, E. Monzani, L. Casella, J. J. Moura, I. Moura, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15, 967-976. DOI: 10.1007/s00775-010-0658-6.
- [61] C. Carreira, O. Mestre, R. F. Nunes, I. Moura, S. R. Pauleta, *PeerJ* **2018**, 6, e5603. DOI: 10.7717/peerj.5603.
- [62] C. Carreira, R. F. Nunes, O. Mestre, I. Moura, S. R. Pauleta, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2020**, 25, 927-940. DOI: 10.1007/s00775-020-01812-0.

>

Cristina Cordas

LAQV - REQUIMTE.

NOVA School of Science and Technology.

Cristina M. Cordas é investigadora sénior do LAQV-NOVA. Licenciada em Química, mestre em Eletroquímica Aplicada (FCUL), e doutorada em Bioquímica (especialização em Bioquímica Física) em 2007 na Universidade NOVA de Lisboa. A área de investigação principal é o estudo de sistemas biológicos através de técnicas de (bio)eletroquímica, para a caracterização de mecanismos redox de proteínas/enzimas e controlo da atividade catalítica. Exemplos representativos são a enzima NOR (desnitrificação) e a LPMO (atividade lítica para polissacarídeos).

c.cordas@fct.unl.pt
ORCID.org/0000-0002-7892-8955

>

***Isabel Moura**

LAQV - REQUIMTE.

NOVA School of Science and Technology.

Doutorada pela UNL em 1981. Professora catedrática aposentada. O principal interesse é a Química Bioinorgânica/Papel dos iões metálicos em Biologia. Durante a sua carreira foi professora visitante da *University of Georgia*, Athens (EUA), Presidente do Departamento de Química e Diretora do Laboratório Asso-

ciado REQUIMTE. Foi nomeada entre as cem portuguesas cientistas pela Ciência Viva. Fez parte do painel de avaliação das *ERC Advanced Grants*. É membro da Academia das Ciências Portuguesa e da Academia das Ciências.

isabelmoura@fct.unl.pt
ORCID.org/0000-0003-0971-4977

>

José J. G. Moura

LAQV - REQUIMTE.

NOVA School of Science and Technology.

Professor Catedrático aposentado de Química da FCT NOVA. No passado, investigador na U. Minnesota e professor adjunto na U. Georgia, Athens (EUA). Interesses científicos: Química Bioinorgânica/Metais em Biologia. Ex-Presidente do Dep. de Química e ex-Presidente do Conselho Científico da FCT, Delegado ao COST e INTAS, membro de Painéis Científicos (FCG, FCT-MCTES, NSF (EUA)) e de vários conselhos editoriais. Presidente da *Society of Biological Inorganic Chemistry* (2010). Membro da Academia das Ciências e da Academia Europeia de Ciências. Diretor da Biblioteca FCT, promovendo interfaces Cultura/Arte/Científica e coordenador do FCT-FabLab. Prémio Ferreira da Silva da SPQ (2022).

jose.moura@fct.unl.pt
ORCID.org/0000-0002-4726-2388

>

Luísa B. Maia

LAQV - REQUIMTE.

NOVA School of Science and Technology.

Doutorada em Bioquímica Clínica e Farmacêutica (FCUL). É investigadora auxiliar no LAQV, onde desenvolve trabalho com vista à caracterização espectroscópica e cinética de metaloenzimas. Presentemente, está particularmente interessada no estudo de novas vias sinalizadoras dependentes de nitrato e nitrito em humanos e de enzimas bacterianas capazes de converterem o CO₂ em produtos de valor acrescentado.

luisa.maia@fct.unl.pt
ORCID.org/0000-0002-6901-6591

>

Marta S. P. Carepo

LAQV - REQUIMTE.

Universidade Lusófona.

Professora associada na Universidade Lusófona, tendo obtido o doutoramento em Bioquímica-Biotecnologia na *NOVA School of Science and Technology* em 2002. Realizou um pós-doutoramento em genómica, transcriptómica e proteómica no Departamento de Genética da Universidade Federal do Pará (Brasil) supervisionado pela Prof.ª Maria Paula Schneider e colaborou com o Consórcio do Projeto Genoma Nacional Brasileiro. Desenvolve a sua investigação no LAQV-

NOVA, focando-se na caracterização espectroscópica (UV-visível, CD, EPR) e funcional de metaloproteínas envolvidas em processos com impacto ambiental ou na área da saúde, tais como proteínas envolvidas na ativação da N₂O_R em *M. nauticus* ou proteínas hémicas sensoras de oxigénio em *M. tuberculosis*.

marta.carepo@ulusofona.pt
ORCID.org/0000-0003-3222-8141

>

Sofia R. Pauleta

UCIBIO.

NOVA School of Science and Technology.

Professora auxiliar no Departamento de Química da *NOVA School of Science and Technology*, sendo doutorada em Bioquímica - Bioquímica-Física (2003). No pós-doutoramento, sob a supervisão do Prof. Ivano Bertini e da Prof.ª Paola Turano, na Univ. de Florença, aplicou metodologias de RMN biomolecular ao estudo de metaloproteínas. Desde 2010 é PI do *Microbial Stress Lab* na UCIBIO-NOVA, que se foca no estudo de sistemas envolvidos na tolerância a metais, redução do peróxido de hidrogénio e desnitrificação em bactérias patogénicas, usando técnicas espectroscópicas, microcalorimetria, cinética enzimática e transcriptómica.

sofia.pauleta@fct.unl.pt
ORCID.org/0000-0002-2149-9416