

*“A maior recompensa do nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma.”*



Agradecimentos

A elaboração de um Trabalho Final de Mestrado é fruto de um trabalho colectivo embora sua elaboração, responsabilidade e *stress* seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo e portanto este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este Trabalho Final de Mestrado fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Agradeço ao Professor Amin Karmali, pelo apoio e orientação científica, e pelo que pude aprender com ele durante a minha formação no Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

Quero expressar o meu mais profundo agradecimento à Dr. Rita Pacheco, pela sua dedicação, paciência, apoio e partilha de saber mas acima de tudo, obrigada por me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento. A sua disponibilidade sem limites, sua forma exigente e criativa de arguir as ideias apresentadas deram rumo, facilitando assim alcançar os objectivos propostos.

A todas as pessoas do laboratório de Bioquímica Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, nomeadamente Eng^a Magda Semedo, Sandra Silva, Eng^a Dulce Gil e Dr. Sónia Martins por todo o apoio prestado na realização deste trabalho e também pelo ambiente vivido neste laboratório.

A todos os amigos e colegas de laboratório, Patrícia, Clara, Viviana, Sara, Ana Rita, Catarina, Inês, Andreia e Gonçalo, o meu muito obrigado pela ajuda, pelo apoio, pelos momentos de lazer por vocês proporcionados.



Quero ainda agradecer à minha família. É graças a eles que me tornei na pessoa que sou hoje. O meu especial obrigado vai para vocês pois sem vocês nada disto teria sido possível. A vocês dedico este Trabalho Final de Mestrado.

Ao Mário pelos momentos partilhados, pelo apoio, dedicação e paciência.



Resumo

No presente trabalho foi executado o encapsulamento de células intactas, extracto celular e amidase purificada (E.C. 3.5.1.4) da estirpe L10 e AI3 de *Pseudomonas aeruginosa* num sistema de micelas invertidas composto pelo surfactante catiónico brometo de tetradeciltrimetilamónio (TTAB) em heptano/octanol 80/20 (v/v).

O efeito do encapsulamento no sistema de micelas invertidas foi estudado avaliando a reacção de transamidação para síntese de ácido acetohidroxâmico, catalisada pela amidase expressa por ambas as estirpes.

No sistema de micelas invertidas fez-se variar conteúdo de água (w_0) e foi estudado o efeito na actividade enzimática e no rendimento de síntese de acetohidroxamato. Os resultados demonstraram um aumento considerável de actividade específica e do rendimento de síntese no sistema de micelas comparativamente ao meio convencional aquoso, sugerindo que a metodologia de encapsulamento do biocatalisador demonstrou potencialidades de utilização na síntese de hidroxamatos, compostos de elevada importância e aplicabilidade. Na variação do conteúdo de água no sistema micelar obteve-se uma curva em sino de actividade específica e de rendimento, com um pico de actividade para $w_0 = 10$, quer em células intactas, extracto celular e amidase purificada de ambas as estirpes. No caso da *Pseudomonas aeruginosa* L10 alcançaram-se actividades específicas de 8, 11 e 103 UI/mg de proteína e rendimentos de 94, 99 e 40 % respectivamente para células intactas, extracto celular e amidase purificada. Quanto à *Pseudomonas aeruginosa* AI3 obtiveram-se, respectivamente, actividades específicas de 5, 9 e 163 UI/ mg de proteína e rendimentos de 66, 66 e 28 % para células intactas, extracto celular e amidase purificada. A estabilidade de armazenamento do biocatalisador no sistema de micelas invertidas e em solução aquosa a 24°C foi avaliada. Este estudo revelou um aumento do $t_{1/2}$ no sistema de micelas face ao armazenamento em solução aquosa convencional. No caso da *Pseudomonas aeruginosa* L10 os melhores resultados foram obtidos para a amidase purificada encapsulada revelando um $t_{1/2}$ de 17 dias. Quanto ao extracto celular da *Pseudomonas aeruginosa* AI3 demonstrou um $t_{1/2}$ de 26 dias quando encapsulado no sistema de micelas. O estudo das alterações estruturais na amidase, de ambas as estirpes, devidas ao encapsulamento em micelas invertidas foi realizado recorrendo à espectroscopia de FTIR. Esta análise permitiu



verificar que a amidase AI3 não alterou significativamente a sua estrutura secundária em micelas invertidas para diferentes w_0 . No entanto, no encapsulamento a sua estrutura secundária sofreu alterações face à estrutura do enzima em solução aquosa. A amidase L10 exhibe apenas alterações estruturais face à estrutura que exhibe em solução aquosa quando confinada em micelas para w_0 3,5 e 4.

Palavras - Chave: amidase (E.C. 3.5.1.4.); *Pseudomonas aeruginosa*; ácido acetohidroxâmico; purificação; micelas invertidas; FTIR; estabilidade de armazenamento; células intactas e extracto celular.



Abstract

The present work involves the entrapment of either purified amidase (E.C. 3.5.1.4), cell-free extract or whole cells from both *Pseudomonas aeruginosa* L10 and AI3 in a reversed micellar system composed of cationic surfactant tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB) in heptane/octanol (80/20%) . The reaction used to study the effect of the encapsulation was a transamidation reaction catalysed by the enzyme amidase (E.C. 3.5.1.4) which is expressed by both bacteria.

The effect of micellar water content (w_0) in enzyme activity and synthesis yield was also evaluated. The results demonstrated a major increase in the activity and yield of acetohydroxamic acid synthesis in reverse micelles when compared with the conventional aqueous system. Such method revealed to be adequate to encapsulate the biocatalyst for hydroxamic acid synthesis, compound which have a wide spectrum of application. A bell-shaped profile was obtained for amidase specific activity in purified amidase, cell-free extract or whole cells at different water content, with a maximum specific activity exhibited at $w_0=10$ for both strains. For *Pseudomonas aeruginosa* L10, this study revealed a specific activity of 8, 11 and 103 UI/ mg protein and yields of 94 , 99 and 40 % respectively for whole cells, cell free extract and purified amidase. While for *Pseudomonas aeruginosa* AI3 whole cells, cell free extract and purified amidase respectively, specific activities of 5, 9 and 163 UI/ mg protein and yields of 66, 66 and 28 % were obtained. Storage stability of the biocatalyst in reverse micelles and in aqueous solution at 24 °C was also analysed. This study revealed an increase on half-life time in reverse micelles comparatively to conventional aqueous solution. With *Pseudomonas aeruginosa* L10, the best results were obtained when using entrapped purified amidase with a half-life of 17 days. In what concerns to *Pseudomonas aeruginosa* AI3 the cell free extract revealed a higher half life of 26 days when entrapped in reverse micelles. The study of the modifications in encapsulated amidase secondary structure, for both strains were analysed by FTIR Spectroscopy. FTIR analysis demonstrated no significant modifications on secondary structure of amidase AI3 in reversed micelles at different water content. However such structure diverges from the enzyme structure in aqueous solution. On the other hand, amidase L10 only



exhibit structural modifications comparatively to conventional medium when entrapped in reversed micelles with w_0 of 3,5 and 4.

Keywords: amidase (E.C. 3.5.1.4.); *Pseudomonas aeruginosa*; acetohydroxamic acid; purification; reverse micelles; FTIR; storage stability; whole cells and cell-free extract.



Abreviaturas

AHA- Ácido acetohidroxâmico;

BSA - Albumina do Soro Bovino;

$C_{\text{proteína}}$ - Concentração de proteína em $\mu\text{g/ml}$;

Da – Dalton;

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético;

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier;

$^2\text{H}_2\text{O}$ - Água deuterada;

Mr – Massa molecular relativa;

PAGE - Nativa - Electroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas;

TMEGB - Tampão Tris-HCl 20mM pH=7,2 contendo 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol e 1mM de benzamidina;

TMEG - Tampão Tris-HCl 20mM pH=7,2 contendo 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA e 10% de glicerol;

TME - Tampão Tris-HCl 20mM pH=7,2 contendo 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA;

TRIS - Trishidroximetilaminometano;

TTAB - Brometo de Tetradeciltrimetilamonio;

w_0 - Conteúdo de água no sistema de micelas invertidas.

Índice

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
ABREVIATURAS	viii

1 INTRODUÇÃO

1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA	4
1.2 ESTIRPES MUTANTES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	4
1.3 AMIDASE (EC 3.5.1.4)	6
1.4 ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES	12
1.5 ÁCIDOS HIDROXÂMICOS	13
1.6 BIOCATALISE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS	14
1.7 MICELAS INVERTIDAS	17
1.7.1 SURFACTANTES:	18
1.7.2 SOLVENTE ORGÂNICO:	19
1.7.3 ÁGUA:	19
1.7.4 SOLUBILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR	19
1.7.5 FACTORES QUE INFLUENCIAM OS SISTEMAS DE MICELAS INVERTIDAS E O BIOCATALISADOR	21
1.8 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA	25
1.8.1 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM MICELAS INVERTIDAS	25
1.9 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)	26

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS	30
2.2 MÉTODOS	30
2.2.1 ESTIRPE BACTERIANA	30
2.2.2 PRODUÇÃO DO BIOCATALISADOR	30
2.2.3 ESTUDO DA REACÇÃO DE SÍNTESE DO ÁCIDO ACETOHIDROXÂMICO	36
2.2.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	37

2.2.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOCATALISADOR AO LONGO DO TEMPO	38
2.2.6	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS POR TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)	39
3	<u>DISCUSSÃO DE RESULTADOS</u>	41
3.1	PURIFICAÇÃO DAS AMIDASES L10 E AI3	41
3.2	BIOCATALISADOR EM MICELAS INVERTIDAS	48
3.3	ESTABILIDADE EM MICELAS INVERTIDAS E EM MEIO CONVENCIONAL AQUOSO	55
3.4	ESTUDO DA ESTRUTURA DA AMIDASE EM DIFERENTES MEIOS	60
4	<u>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</u>	72
4.1	CONCLUSÕES	72
4.2	PERSPECTIVAS FUTURAS	75
5	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	79
6	<u>ANEXOS</u>	91
6.1	CURVAS DE CALIBRAÇÃO	92
6.2	ESTUDO DA ESTRUTURA DA AMIDASE EM DIFERENTES MEIOS	94

Capítulo I

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa pertencente à família das *Pseudomonadaceae* e do género *Pseudomonas* apresentando células flageladas na forma de bastonete (Figura 1) ¹.

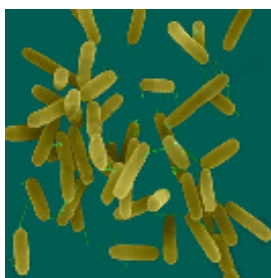


Figura 1- Imagem de microscopia electrónica de varrimento das células de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado da referência 2 .

Estas bactérias são quimiorganotróficas utilizando o oxigénio com oxidante terminal, embora alguns destes seres consigam sobreviver em meios com nitrato ¹.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogénica associada a diversas doenças humanas e, uma vez que produz bacteriocinas específicas e é resistente a uma vasta gama de antibióticos e desinfetantes, pode ser fitopatogénica ³.

O genoma desta bactéria foi sequenciado por Stover e seus colaboradores ³. A descoberta desta sequência permitiu estabelecer a relação entre o tamanho do genoma e a sua complexidade com a versatilidade desta bactéria ³.

1.2 *Estirpes mutantes de Pseudomonas aeruginosa*

A estirpe *Pseudomonas aeruginosa* 8602 produz uma amidase (EC 3.5.1.4) capaz de hidrolisar amidas simples, como é o caso da acetamida e propionamida, e estas amidas podem ser utilizadas como substratos durante o seu crescimento como fonte de carbono e azoto pela hidrólise destas a amónia e correspondentes ácidos carboxílicos. A expressão da amidase é induzida pela presença de amidas sendo codificada pelo gene estrutural *amiE* que se encontra aliado ao gene regulador *amiR*. ^{4, 5, 6}.



Mutações no gene estrutural ou no gene regulador ou em ambos tornam as bactérias desta espécie capaz de crescer na presença de outras amidas. De facto, a amidase da *Pseudomonas aeruginosa*, codificada pelo gene *amiE*, apresenta uma especificidade para amidas alifáticas de cadeia curta, mas após uma mutação neste gene o enzima pode adquirir especificidade para maior gama de substratos, incluído amidas de cadeia mais longa^{7,8}.

Brammar e seus colaboradores, utilizando agentes mutagénicos como a irradiação por ultravioleta, tratamento com M-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ou sulfonato de etilmetano entre outros obtiveram a partir da *Pseudomonas aeruginosa* 8602 várias estirpes mutantes apresentando diferentes características diferentes entre si e várias dessas estirpes produziam amidase⁹.

A estirpe L10 é uma das mutantes constitutivas obtida a partir da estirpe selvagem 8602 devido a uma mutação espontânea no gene regulador *amiR*. Tal mutação levou à produção da amidase constitutivamente, portanto insensível à repressão catabólica, produzida sem necessidade da presença de indutores ou substratos

Quanto às estirpes mutantes AI3, Ph1, AIU1N e OUCH4 da *Pseudomonas aeruginosa* produzem amidases alteradas, uma vez que a mutação surgiu no gene *amiE*, exibindo especificidade para substratos e inibidores diferentes (Tabela 1)^{10,11,12}.

A amidase da estirpe selvagem 8602 e a amidase de L10 apenas hidrolisam amidas alifáticas de cadeia curta, em contrapartida as amidases das estirpes mutantes catalisam a hidrólise de amidas substituídas como é o caso da butiramida e da valeramida¹². Por outro lado, as amidases da estirpe selvagem são extremamente sensíveis à inibição pela ureia e pela hidroxureia enquanto os enzimas mutantes Ph1, AIU1N e OUCH4 se tornaram resistentes à inibição por estes compostos devido a um decréscimo da afinidade para a ligação com a ureia¹². A alteração da especificidade para o substrato apresentada pelos vários mutantes da *Pseudomonas aeruginosa* 8602 demonstra a importância que existe entre a relação estrutura/função da amidase presente nestas estirpes.

A estirpe mutante L10 apresenta especificidade para a acetamida que pode ser utilizada como única fonte de carbono durante o crescimento, sendo que a acetanilida é um substrato pouco propício ao crescimento.



Em contrapartida a estirpe AI3 deriva da estirpe L10 e utiliza a acetanilida como fonte de carbono durante o seu crescimento. A estirpe AI3 produz uma amidase que comparada com a amidase selvagem apresenta diferente especificidade de substratos.

Estirpe	Classe de amidase mutante	Estirpe mãe	Meio de isolamento*
PAC 142 (L10)	Constitutivo	8602	succinato/lactamida
PAC 366 (AI3)	Constitutivo/amidase alterada	L10	acetanilida/NH ₄ ⁺
PAC (AIUIN)	Constitutivo/amidase alterada	AI3	acetanilida/ureia
PAC (OUCH4)	Constitutivo/amidase alterada	AI3	acetamida/NH ₄ ⁺ /hidroxiureia

Tabela 1- Seleção metabólica de diversos mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*.
*Fontes de carbono e azoto^{10, 13, 14}.

Aparentemente a versatilidade da amidase da estirpe mutante AI3 é devida a uma mutação no gene *amiE* Thr¹⁰³→Ile é responsável pela especificidade para a acetanilida *p*-nitroacetanilida^{15, 16}. Outro factor bastante importante é a perda de termoestabilidade do enzima expresso pela estirpe AI3. A amidase selvagem e a mutante constitutiva L10 quando submetidas a um choque térmico de 60 °C não apresentam perdas na sua actividade catalítica, daí durante o processo de purificação destes enzimas ter sido incluído um passo de desnaturação térmica. Quanto ao enzima expresso pela estirpe AI3 sofre uma perda de actividade catalítica quando sujeita a esta temperatura, quer se encontre no extracto celular quer se encontre na forma purificada, o que indica que aparentemente este enzima possui uma conformação menos estável que os enzimas selvagem e da estirpe L10¹³.

1.3 Amidase (EC 3.5.1.4)

A maior parte das amidases conhecidas podem ser isoladas a partir de inúmeros géneros de bactérias nomeadamente *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*,



*Mycobacterium, Micrococcus, Brevibacterium, Nocardia, Streptomyces, Blastobacter, Arthrobacter, Alcaligenes, Helicobacter, Lactobacillus, Klebsiella e Methylophilus*¹⁷.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) estabeleceu a existência de 73 classes de proteínas capazes de hidrolisar ligações carbono – azoto em aminas lineares (EC 3.5.1). Esta classificação representa um grupo de actividade catalítica as amidohidrolases, mas não é representativa de homologia estrutural destes enzimas¹⁸.

Na classe EC 3.5.1. inserem-se as amidases alifáticas que hidrolisam apenas amidas alifáticas de cadeia curta. A acetamida, acrilamida e propionamida são os substratos que são mais rapidamente hidrolisados pelas amidases pertencentes a esta classe¹⁷. Existe ainda outra classe de amidohidrolases as EC 3.5.2 que hidrolisam amidas, arilamidas, α -aminoamidas e α -hidroxiamidas. A propionamida, isobutiramida, valeramida e hexanoamida são os substratos que são mais rapidamente hidrolisados pelas amidases pertencentes a esta classe¹⁷.

A amidase alifática (EC 3.5.1.4) da *Pseudomonas aeruginosa* 8602 foi descoberta por Kelly e Clarke em 1962. Posteriormente, em 1964, Kelly e Kornberg purificaram parcialmente a amidase e demonstraram que o enzima também pode catalisar a transferência do grupo acilo de uma amida para uma hidroxilamina de modo a formar-se o correspondente acilo hidroxamato^{19,20}. Na altura, o controlo da síntese enzimática e a especificidade para com diferentes substratos começam a ser conhecidos. Inicia-se uma época em que são exploradas através de mutações a possibilidade de novas potencialidades como sendo a especificidade para diferentes substratos que o enzima não demonstrava no estado selvagem. Para complementar estes estudos a sequência aminoacídica do enzima selvagem começou a ser estudada em 1973. Em 1978, a maior parte desta sequência é conhecida e, em 1987, foi concluída juntamente com a publicação da sequência nucleotídica de 1038 nucleótidos do gene *amiE*, que codifica a expressão da amidase alifática da *Pseudomonas aeruginosa* Brammar *et al*⁴.

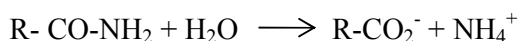
A amidase alifática (acilamida amidohidrolase; EC 3.5.1.4) codificada pelo gene *amiE* do cromossoma da *Pseudomonas aeruginosa* 8602 é um enzima homo-hexamérica, com aproximadamente 38 KDa de peso molecular para cada subunidade perfazendo uma massa molecular total de aproximadamente 230 KDa²¹.



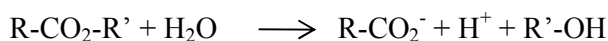
A amidase desta estirpe catalisa a hidrólise de um pequeno grupo de amidas alifáticas e apresenta também para actividade de hidrolase de ácidos e ésteres alifáticos de cadeia curta, no entanto a velocidade destas reacções é inferior comparativamente às reacções de hidrólise de amidas ⁶.

Para além disso, transfere o grupo acilo de amidas de cadeia pequena, para um aceitador de grupos acilo como a hidroxilamina (reacção de transferase – transamidação). Resumidamente, as várias reacções catalisadas pela amidase encontram-se esquematizadas de seguida e foram descritas por Brown *et al.* em 1973 demonstrando a enorme versatilidade deste enzima ⁶:

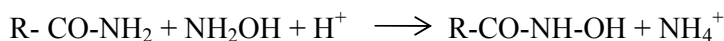
1. Reacção de hidrólise de amidas:



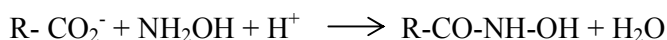
2. Reacção de hidrólise de esteres:



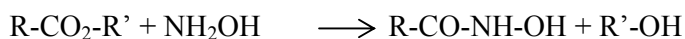
3. Reacção de transferase (transamidação):



4. Reacção de transferase (ácidos):



5. Reacção de transferase (ésteres):



A amidase alifática pertence à superfamília das nitrilases, que são uma classe de enzimas demonstrando homologia estrutural, no entanto estas encontram-se distribuídas por onze ramos de classificação de acordo com o tipo de reacções que catalisam ²¹.

As nitrilases são enzimas que possuem um grupo tiol e estão envolvidas na degradação de nitrilos, convertendo-os no ácido carboxílico correspondente e amónia, através de um intermediário tetraédrico, sem a formação intermédia de uma amina. São ainda responsáveis pela biossíntese de produtos naturais e estão envolvidas em modificações



pós-traducionais. A actividade de nitrilase tem sido reportada em animais, fungos, plantas e alguns procariontes²¹.

As nitrilo hidratases também pertencem à superfamília das nitrilases catalisam a reacção de conversão dos nitrilos em amidas e que na natureza actuando conjuntamente com as amidases formam ácido carboxílico e amónia a partir das amidas²².

A utilização de mutagénesis dirigida, por Farnaud *et al.*, permitiu a identificação dos resíduos aminoácidos relacionados com a especificidade para com um determinado substrato e com o mecanismo catalítico. A superfamília das nitrilases tem um resíduo de cisteína, Cys, como centro activo nucleófilo interagindo com o grupo carbonilo (C=O) do substrato amida formando um complexo acilo intermediário^{17, 23}. Novo *et al* propuseram para a amidase de *Pseudomonas aeruginosa* uma tríada catalítica composta pelos resíduos Cys¹⁶⁶-Glu⁵⁹-Lys¹³⁴, característica dos enzimas pertencentes à família das nitrilases¹⁶, e esta foi posteriormente confirmada na publicação da estrutura tridimensional da amidase por Andrade *et al* em 2007 (Figura 2)²¹.

A amidase utiliza como centro activo nucleófilo, o resíduo Cys¹⁶⁶ que está localizado no fundo de uma bolsa catalítica (“pocket”), nomeadamente numa volta (“turn”) entre uma folha- β e uma hélice- α , conhecida como “cotovelo” nucleófilo²¹.

A amidase nativa de *Pseudomonas aeruginosa* é um homohexâmero em que cada subunidade da amidase apresenta um arranjo de quatro camadas, tipo “sandwich” $\alpha\beta\beta\alpha$ (33% hélices- α e 22% folhas- β) com duas folhas- β internas²¹. No entanto, relativamente às outras nitrilases, a amidase apresenta uma folha- β adicional na cadeia N-terminal e uma cadeia C-terminal mais longa, tal como se observa na Figura 3²¹.

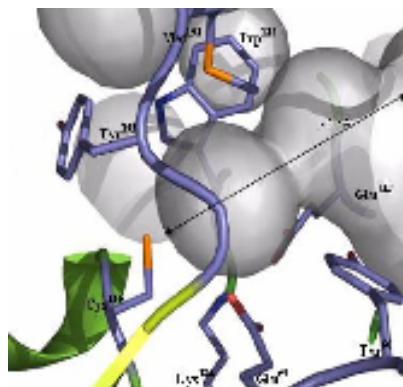


Figura 2-Representação da tríada catalítica Cys¹⁶⁶-Glu⁵⁹-Lys¹³⁴ da amidase. Adaptado de referência 21.

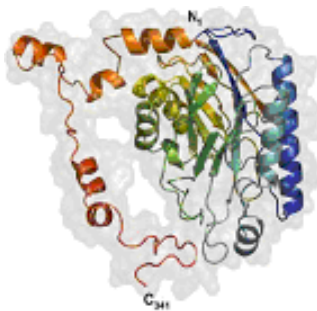


Figura 3- Representação esquemática do monômero de *Pseudomonas aeruginosa*. O monômero revela uma estrutura com quatro camadas tipo “sandwich” com uma região C terminal extensa incluindo diversos segmentos α -hélice. Adaptado de referência 21.

Os seis centros activos da amidase estão acessíveis através de uma entrada em forma de túnel com uma cavidade com 13Å de profundidade onde se encontra a tríada catalítica. A estrutura da bolsa catalítica é moldada pelos resíduos da tríada e no interior desta o substrato estabelece uma ligação covalente ao átomo de enxofre presente no nucleófilo Cys¹⁶⁶. No entanto existem outros resíduos de aminoácidos importantes no mecanismo catalítico. O volume e acesso limitado à bolsa catalítica condicionam a especificidade da amidase para com determinados substratos, o que demonstra a importância de outros resíduos de aminoácidos vizinhos que permitam o acesso aos substratos e a saída dos produtos da reacção²¹. O resíduo de Trp¹³⁸, por exemplo, parece desempenhar um papel importante tanto no mecanismo de catálise enzimática bem como na estabilidade estrutural da amidase alifática dado que a substituição deste resíduo por Gly induz uma alteração da especificidade da amidase. A substituição do resíduo Trp¹³⁸ por Gly ou Ser originou amidase mutante sem afinidade para a ureia e actividades reduzidas para a acetamida e para a acrilamida quando comparadas com a enzima selvagem. Por outro lado, estas mutações permitiram a hidrólise de fenilacetamida bem como de p-nitrofenilacetamida²¹. Quanto à substituição do resíduo Thr¹⁰³ por um resíduo de Ile que originou a amidase mutante AI3 nada foi ainda elucidado que justifique as alterações de termoestabilidade e especificidade de substratos face à estrutura do enzima selvagem¹⁶. A amidase tem vindo a tornar-se cada vez mais um foco de atenção uma vez que apresenta uma vasta gama de aplicações desde a terapêutica à indústria bem com nas áreas de tratamento de efluentes industriais e investigação. Em alguns casos é o enzima



que é aplicado directamente enquanto noutros recorre-se à utilização de produtos de reacção catalisados por este enzima.

Entre as diversas aplicações destaca-se a capacidade de transferir o grupo acilo de amidas de cadeia pequena, ácidos e ésteres para um aceitador de grupos acilo como a hidroxilamina dando origem aos ácidos hidroxâmicos²⁴. Assim pode produzir-se uma ampla vasta gama de ácidos hidroxâmicos em grande escala recorrendo à utilização de amidase dada as alterações de especificidade de substrato que poderão ser induzidas nos mutantes deste enzima. A amidase catalisa o passo final da reacção de transformação dos nitrilos em produtos de interesse comercial como é exemplo os L- aminoácidos, que são utilizados na produção de antibióticos, péptidos, inibidores de proteases e vitaminas entre outros, desempenhado portanto um papel importante na indústria da química fina^{25, 26, 27}.

Quanto à detecção e eliminação de acrilamida nos alimentos, a amidase poderá ser útil visto que esta amida é neurotóxica sendo produzida durante o processo de fabrico de certos alimentos de que são exemplo as batatas fritas entre outros, como resultado da exposição de determinados aminoácidos a elevadas temperaturas, e de modo mais intenso quando combinados com glícidos redutores²⁸.

Na produção de ácido acrílico o enzima poderá ser imobilizado num reactor tendo como substrato a acrilamida. O ácido acrílico é utilizado como matéria-prima para uma vasta gama de processos de química industrial destinados à obtenção de resinas sólidas, tecidos e tintas.

Na biorremediação, a amidase pode ser utilizada na bioconversão de amidas tóxicas tornando-as em compostos de baixa toxicidade, nomeadamente a formamida e acrilamida presentes em efluentes industriais^{27, 28, 29}.

Em suma existe uma mais-valia na aplicação da amidase, que reside no facto deste enzima ter aplicabilidade numa vasta gama de campos que é consequência de uma grande diversidade na sua especificidade, ao nível do substrato, conseguida por pequenas substituições na sequência aminoacídica. Isto torna-se de elevada importância uma vez que proporciona a obtenção de variadas amidases capazes de degradar muitas amidas diferentes estruturalmente obtendo-se assim diferentes produtos destas reacções³⁰.



1.4 Enzimas como biocatalisadores

Enzimas podem ser definidas como catalisadores biológicos, na medida em que promovem um aumento considerável da velocidade das reacções químicas que ocorrem no interior das células e organismos sem ocorrerem alterações na sua estrutura. Como qualquer outro catalisador, os enzimas aumentam a velocidade das reacções relativamente à reacção não catalisada sem se consumirem, não havendo alteração do equilíbrio químico dessa reacção³¹.

Os enzimas como catalisadores biológicos apresentam diversas vantagens comparativamente aos catalisadores químicos, especialmente devido à sua elevada especificidade para determinado reagente transformando-o num determinado produto, em alguns casos régio- e enantioselectividade originando produtos enantiomericamente puros e em conformidade com normas para aplicações industriais. Para além disso há ainda que considerar que os catalisadores biológicos operam a temperaturas e pressões moderadas e dentro de uma gama de valores de pH moderada sendo por isso considerados mais eficientes energeticamente que os catalisadores químicos o que permite alcançar redução de custos e um menor impacto no meio ambiente. A produção e o uso de biocatalisadores é uma área em expansão no mundo inteiro, devido à grande diversidade de catalisadores biológicos, à disponibilidade de técnicas modernas para seu aproveitamento e, sobretudo, à sua viabilidade económica³¹.

Estes catalisadores aceleram uma reacção reversível em ambos os sentidos. A velocidade de uma determinada reacção corresponde à conversão de um determinado número de moles de substrato por unidade de tempo. Portanto pode dizer-se que, em certas condições, uma molécula de enzima possui uma actividade característica. A determinação dessa actividade é um aspecto de bastante relevância para a caracterização de um sistema de reacção catalisado por um enzima³¹.

A actividade enzimática pode ser influenciada por factores como a natureza do substrato, o pH, a temperatura, a presença de inibidores ou activadores e a natureza do solvente em que ocorre a reacção³¹.



1.5 Ácidos Hidroxâmicos

A ocorrência de ácidos hidroxâmicos na natureza foi reportada pela primeira vez por J. B. Neilands e Neilands em 1967³². Estes compostos estão presentes em microrganismos como é o caso de fungos, bactérias e leveduras onde desempenham o transporte de ferro presente no meio exterior através da parede celular³².

Esta família de compostos tem vindo a suscitar bastante interesse uma vez que apresentam uma vasta gama de aplicações devido às suas propriedades químicas, biológicas e baixa toxicidade. De fórmula geral $R-C=O-NH-OH$ actuam como inibidores de enzimas associados a doenças e como quelantes apresentando uma forte afinidade para com alguns iões metálicos. Muitas das suas propriedades devem-se ao seu elevado potencial quelante^{33, 34}.

Estes compostos são conhecidos por inibir enzimas como a colagenase e outras metaloproteinases da matriz^{35, 36}.

Vários ácidos hidroxâmicos são utilizados na indústria farmacêutica uma vez que podem fazer parte da composição de factores de crescimento, antibióticos³⁷, antagonistas de antibióticos³⁸, inibidores de tumores³⁹, agentes anti- fúngicos e anti-bacterianos⁴⁰ e anti-cancerígenos³³. Alguns deles têm mesmo sido investigados como agentes anti-HIV^{34, 36}.

Noutras áreas como a fitoquímica e agronomia os ácidos hidroxâmicos têm demonstrado também aplicabilidade no aumento da resistência a insectos e a organismos patogénicos nas plantas⁴¹ podendo ser utilizados como pesticidas⁴². Para além disso estes ácidos têm utilizações no campo do tratamento de águas residuais e na tecnologia nuclear na eliminação de iões metálicos contaminantes. No campo da química analítica são utilizados como reagentes para a determinação espectrofotométrica e gravimétrica de metais⁴³.

Os ácidos hidroxâmicos de cadeia longa podem ser usados como surfactantes na indústria dos detergentes sendo que os de cadeia curta que são bastante solúveis em água pode ser utilizados na produção de resinas com propriedades quelantes^{33, 44, 45}.

Os diversos métodos descritos para a síntese química de ácidos hidroxâmicos e seus derivados apresentam algumas desvantagens devido ao facto de requererem muitos solventes e temperaturas elevadas o que torna a produção dispendiosa. Devido às



enunciadas vantagens da utilização de biocatalisadores na síntese de vários compostos químicos, a produção destes compostos por biocatálise surge como uma alternativa viável à síntese química. Enzimas como a amidase de *Rhodococcus sp.* e de *Pseudomonas aeruginosa* e a lipase from *Candida parapsilosis* foram utilizadas com sucesso, com elevados rendimentos de bioconversão, na síntese de ácidos hidroxâmicos ^{45, 46}.

O ácido acetohidroxâmico (AHA) e os seus derivados estão reportados na literatura como sendo compostos inibidores de ligação lenta da urease microbiana e vegetal. Mais recentemente Benini et al. obteve cristais de urease de *Bacillus pasteurii* inibida pelo ácido acetohidroxâmico. A ligação deste composto revelou uma interação quelante semelhante àquela que se estabelece nas outras metaloenzimas. De modo semelhante, a enzima na forma pura do *Anthrobacter mobilis* é também inibida pelo ácido acetohidroxâmico ⁴⁷. De facto, o AHA tem uma importante aplicação na área da medicina pois ao inibir a urease impede o aumento de amónia na urina responsável pelo aparecimento de cálculos renais. Para além disso aumenta a eficácia de agentes antimicrobianos, como antibióticos, ao inibir a síntese da ureia e por diminuição da percentagem de amónia com uma consequente diminuição do pH ⁴⁸.

1.6 Biocatálise em meios não convencionais

Os termos biocatálise ou biotransformação abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato num número limitado de etapas enzimáticas. Enzimas isolados ou células íntegras, quer na forma livre quer na forma imobilizada, têm sido usados como biocatalisadores.

Nas últimas décadas, a biocatálise tornou-se importante na produção de muitos compostos importantes, como materiais para a síntese de polímeros, enantiómeros puros para produção de fármacos e agroquímicos, antibióticos, ingredientes da indústria alimentar, como adoçantes e vitaminas, etc ^{49, 50, 51}.

As primeiras aplicações das enzimas na indústria química envolviam biotransformações realizadas em meios aquosos. No entanto, verificou-se que a utilização de água como solvente limita a gama de aplicações e a produtividade de determinados processos nomeadamente processos envolvendo substratos hidrófobos ⁵². Na realidade, muitos



enzimas operam *in vivo* em meios ricos em lípidos hidrófobos, o que indica que meios não aquosos poderão ser adequados à actividade catalítica dos enzimas. Em 1984, desvaneceu-se a convicção relativamente à impossibilidade de utilizar solventes não aquosos na biocatálise⁵³. De entre as vantagens podem-se destacar: a solubilização de compostos não-polares (substratos e produtos), a redução de efeitos inibitórios/tóxicos de substratos e/ou produtos, o deslocamento do equilíbrio químico a favor da síntese em detrimento da hidrólise (por exemplo síntese de ésteres, péptidos e lactonas), o deslocamento do equilíbrio da reacção através do controlo da actividade da água (por exemplo hidrólise de anidridos de ácidos e polimerização de quinonas), a possibilidade destas reacções ocorrerem a temperaturas muito mais elevadas, a fácil recuperação do produto a partir de solventes de baixo ponto de ebulição, a redução da inibição pelo substrato e/ou produto e a eliminação de contaminações microbianas^{31, 54, 55}.

Apesar de algumas potenciais desvantagens como baixas actividades enzimáticas, quando comparadas com meios aquosos, limitações difusionais, sobretudo no caso de catalisadores imobilizados, ou toxicidade (de alguns solventes orgânicos), o estudo pioneiro de Zaks e Klibanov em 1984⁵³ foi seguido de muitos outros, e as aplicações comerciais deste tipo de sistemas têm-se multiplicado. São disso exemplo a produção de aminas e álcoois quirais para a produção de farmacêuticos e pesticidas catalisada pela lipase de *Burkholderia plantarii* imobilizada, realizada pela BASF, a produção de um fármaco anti-colesterol obtido por acilação em tolueno catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada, realizada pela Bristol-Myers-Squibb, ou a produção de palmitato e miristato de isopropilo para a produção de sabões, cremes e lubrificantes, obtidos por esterificação em 2-propanol catalisada pela lipase da *Candida antarctica*, realizada pela Uniquema⁵³.

A escolha do solvente orgânico mais apropriado para um determinado sistema biocatalítico deve cumprir determinados requisitos físico-químicos, de segurança, logísticos, económicos e biológicos. Relativamente aos critérios físico-químicos, podem-se destacar a capacidade de extracção (coeficiente de partição) e solubilização de substratos e/ou produtos pelo solvente orgânico. O solvente deverá ser química e termicamente estável, não deve formar emulsões em meio aquoso, deve apresentar uma viscosidade reduzida e não pode ser degradado pelo biocatalisador. Em termos de segurança, não deve ser inflamável nem deve apresentar toxicidade ambiental nem ser



prejudicial para a saúde. Do ponto de vista logístico, a sua disponibilidade deve ser elevada e a sua reciclagem deve ser viável. Quanto ao aspecto económico, o solvente orgânico deve ser o menos dispendioso possível. O critério biológico, é o aspecto mais restritivo, uma vez que engloba a toxicidade do solvente orgânico para o biocatalisador que poderá causar a inibição enzimática, desnaturação de proteínas e alteração do DNA do enzima^{31, 56}.

Quanto à toxicidade de fase, esta está associada ao contacto directo entre o biocatalisador e o solvente orgânico. Esta acção tóxica é mais notória com solventes orgânicos hidrófobos, devido à sua baixa partição para o filme aquoso que rodeia o biocatalisador. Este factor faz com que a possibilidade de se atingir um valor de concentração crítica do solvente na membrana celular, a partir da qual é observada esta acção tóxica, seja reduzida. Este tipo de toxicidade pode ser minimizada utilizando uma área interfacial menor, uma agitação mais suave ou diminuindo a razão volumétrica das fases orgânica/aquosa, de forma a reduzir os fenómenos de emulsão e agregação. A imobilização do biocatalisador e o *design* de biocatalisadores mais resistentes a solventes orgânicos, são também boas possibilidades para a redução da toxicidade de fase³¹.

Os sistemas de biocatálise com solventes orgânicos podem ser classificados de acordo com a natureza da mistura (Figura 4): mistura homogénea de meio aquoso com solventes orgânicos miscíveis em água; mistura de duas fases líquidas orgânico-aquosas; biocatalisadores dissolvidos em solventes orgânicos como micelas invertidas; biocatalisadores ressuspensos em solventes orgânicos com baixos teores de água como enzimas liofilizadas ou biocatalisadores imobilizados na ausência de fase aquosa³¹.

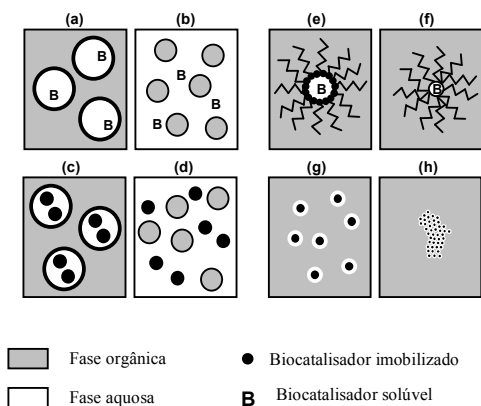


Figura 4- Sistemas biocatalíticos englobando solventes orgânicos: (a) sistemas de duas fases líquidas orgânico-aquosas; (b) sistemas de duas fases líquidas orgânico-aquosas; (c) e (d) biocatalisador imobilizado num suporte poroso, num sistema bifásico; (e) biocatalisador microencapsulado numa micela invertida; (f) biocatalisador modificado com PEG e dissolvido em meio orgânico; (g) biocatalisador imobilizado e ressuspensão em meio orgânico; (h) biocatalisador liofilizado ou na forma de cristais, ressuspensão em meio orgânico. (Adaptado da referência 31)



1.7 Micelas invertidas

Matinek foi o primeiro a reportar a retenção de actividade catalítica da peroxidase e da α - quimiotripsina em sistemas de micelas invertidas de AOT (dioctilsulfosuccinato de sódio) em solvente orgânico. Desde essa altura, várias reacções neste tipo de sistemas catalisadas por enzimas tem sido estudadas como é o caso da hidrólise de triglicéridos, ácidos gordos e glicerol pelas lipases⁵⁷ e da hidrólise das ligações pépticas pela α -quimiotripsina⁵⁸.

As micelas invertidas formam-se dissolvendo um surfactante em solvente orgânico, com uma quantidade limitada de água, formando-se assim uma solução opticamente transparente e homogénea, que simula um sistema de membranas biológico^{46, 59}.

A estrutura de uma micela invertida pode se descrita como um micro-domínio aquoso rodeado por uma monocamada constituída por moléculas de surfactante dispersas num solvente orgânico de baixa polaridade. Nas micelas inversas, as cabeças polares das moléculas de surfactante estão em contacto e hidratadas pelas moléculas de água que se encontram na esfera interior da micela, ao passo que as caudas hidrofóbicas das moléculas de surfactante (lineares ou ramificadas) estão orientadas e em contacto com o solvente orgânico (apolar) que as rodeia. Estes sistemas são termodinamicamente estáveis devido à presença da camada de moléculas de surfactante que evita o contacto entre a água e o solvente orgânico^{60, 61, 62, 63}.

Os grupos polares das micelas são capazes de solubilizar uma quantidade mínima de água, que apresenta propriedades físicas e químicas semelhantes às moléculas de água adjacentes às membranas biológicas e diferentes das moléculas de água que se encontram em solução aquosa^{59, 63, 64}. As micelas invertidas podem formar-se quer na presença quer na ausência de água. Se o meio estiver completamente livre de água, os agregados formados são bastante pequenos e dispersos portanto quando se pretende a obtenção de agregados de surfactantes maiores tem de existir água disponível^{65, 66}.

Assim pode-se dizer que as micelas inversas são agregados aproximadamente esféricos de moléculas de surfactante com dimensões entre 0-10 nm (gama termodinamicamente estável), apresentando como constituintes moléculas anfóliticas de surfactante, um solvente orgânico apolar e água^{31, 63, 64}.

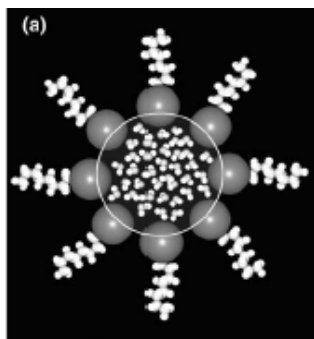


Figura 5- Representação esquemática de um sistema de micelas invertidas. Adaptado da referência 67.

Um sistema de micelas invertidas pode ser aplicado como um meio para realizar biocatálise, contendo solvente orgânico e um biocatalisador confinado no reduzido conteúdo de água do interior da micela. Este tipo de sistemas pode ser comparado a um micro reactor, no qual o biocatalisador está imobilizado na esfera aquosa, onde se assume que este mantém a sua conformação e actividade, estando também protegido dos efeitos adversos do solvente orgânico^{31,68}.

O biocatalisador permanece solúvel na esfera aquosa o que evita problemas de transferência de massa, que poderiam ter como consequência um retardamento na velocidade da reacção³¹. Estes sistemas têm ainda a possibilidade de poderem ser transformados num sistema contínuo de reacção utilizando um reactor de membrana³¹.

1.7.1 Surfactantes:

Os surfactantes são moléculas anfólicas que apresentam uma região polar hidrofílica e outra apolar hidrofóbica, sendo estas designadas por cabeça e cauda respectivamente capazes de interagir com as interfaces^{57, 59, 69}.

A região apolar pode ser constituída por uma ou mais cadeias, onde o limite são quatro cadeias. As cabeças das moléculas de surfactante podem ou não estar carregadas no seu grupo polar podendo ser classificados como aniónicos (por exemplo AOT, dioctilsulfosuccinato de sódio), cationicos (por exemplo TTAB, brometo de tetradeciltrimetilamónio), anfólitos (por exemplo lisolecitinas) e não iónicos (por exemplo isoálcool de polioxietileno^{57, 59, 69}).



As moléculas de surfactante são capazes de se agregar espontaneamente em soluções aquosas formando micelas e, em solventes orgânicos formando micelas invertidas ⁶⁹.

1.7.2 Solvente orgânico:

A escolha de um solvente não polar é condicionada pela sua compatibilidade com o surfactante e o biocatalisador. Para o biocatalisador, a presença de um solvente orgânico permite a ocorrência de reacções de síntese que são levadas a cabo controlando o conteúdo de água e/ou com solubilização de substratos hidrofóbos. Neste caso, o objectivo é conseguido com uma maior área interfacial do que nos sistemas bifásicos, minimizando os problemas de transferência de massa ⁶⁹.

1.7.3 Água:

Os grupos polares das micelas têm a capacidade de solubilizar uma quantidade significativa de água. A localização da esfera aquosa permite a protecção do biocatalisador em relação aos efeitos adversos do solvente orgânico ^{63, 68}.

1.7.4 Solubilização do biocatalisador

A estrutura das biomoléculas é bastante sensível aos meios não convencionais utilizando solventes orgânicos. De modo a evitar a desnaturação do biocatalisador e seus constituintes existem três processos pelos quais estes podem ser solubilizados em soluções de micelas invertidas ^{68, 69, 70, 71}:

1. Injecção, onde uma alíquota do biocatalisador em solução aquosa é adicionada ao surfactante dissolvido no solvente orgânico. A mistura resultante é vigorosamente agitada até ser obtida uma solução transparente ^{68, 69, 70, 71} ;
2. Transferência de fase, o surfactante e o biocatalisador são dissolvidos respectivamente no solvente orgânico e na solução aquosa. As soluções são depois misturadas dando origem ao sistema de micelas invertidas ^{68, 69, 70, 71};
3. Dissolução, o biocatalisador liofilizado é adicionado sob agitação vigorosa às micelas invertidas, que já contêm o conteúdo de água desejado ^{68, 69, 70, 71}.



A capacidade máxima de solubilização do sistema de micelas inversas está dependente do método de adição do biocatalisador ao sistema.

No caso da injeção, a relação entre solubilização do biocatalisador e o tamanho da micela não está totalmente esclarecida ^{68, 69, 70, 71}. O método da injeção é frequentemente utilizado devido à simplicidade ^{68, 69, 70, 71}. O método da transferência de fase tem desvantagens pois não permite o ajuste do conteúdo de água e apenas atinge o equilíbrio ao fim de um tempo podendo ocorrer inativação do biocatalisador. O método da dissolução é mais moroso que o método da injeção e frequentemente leva à desnaturação do biocatalisador pois há um contacto prolongado entre o enzima e o solvente orgânico/surfactante ^{68, 69, 70, 71}.

Interações hidrofóbicas, de Van der Waals, electrostáticas e pontes de hidrogénio mantêm estes sistemas unidos, mas a fluidez das micelas é permanente uma vez que não se formam ligações do tipo covalente nesta estrutura ⁶⁸. Estes sistemas são entidades dinâmicas, que trocam os seus constituintes entre micelas ou entre a micela e o solvente orgânico ⁶⁸.

Comparativamente a outros meios, as micelas inversas apresentam uma área interfacial maior, o que tem um grande interesse tecnológico uma vez que este aumento se traduz num aumento das moléculas de substrato que estão disponíveis para reagir, ou seja, existe um contacto mais eficiente entre o biocatalisador e o substrato ⁵⁷. Todas estas propriedades dinâmicas tornam a definição do sistema de micelas inversas bastante complexa, contudo os estudos já efectuados permitem definir os factores que influenciam quer micela quer a biocatálise ⁶⁸.

Quanto à influência na cinética e estrutural do biocatalisador utilizado devido à utilização deste tipo de sistema não convencional, trabalhos realizados demonstram que a utilização destes sistemas permite um aumento na actividade catalítica dos biocatalisadores encapsulados relativamente à actividade que se verificava em solução aquosa. Muitos estudos existentes apontam para que a actividade e estabilidade do biocatalisador esteja estreitamente relacionada com a dimensão da micela, no entanto certos parâmetros que influenciam a actividade do biocatalisador acabam também por influenciar a estrutura da micela inversa ⁴⁶.



Estes sistemas não convencionais têm uma vasta gama de aplicações no campo da enzimologia, química das proteínas e em muitas outras áreas relacionadas com biotransformações. Assim sendo podemos designar um sistema de micelas inversas como um “nanobioreactor” individual que permite a revelação de novas propriedades que podem ser usadas em benefício da biocatalise⁶².

Os sistemas de micelas invertidas tem sido aplicados em conversões enzimáticas de substratos com baixa solubilidade em água, como a conversão de esteróides, glicéridos bem como ácidos e álcoois de cadeia longa³¹.

1.7.5 Factores que influenciam os sistemas de micelas invertidas e o biocatalisador

A compreensão dos factores que afectam as propriedades dos biocatalisadores em solventes orgânicos, nomeadamente a actividade enzimática, estabilidade, estrutura e a selectividade, encontra-se hoje em dia quase comparável com o nível de conhecimento da biocatálise em meio aquoso.

O efeito do conteúdo de água no sistema de micelas inversas na actividade do enzima tem sido um dos aspectos mais estudados⁶⁸.

O conteúdo de água (w_0) e a actividade da água (a_w) são dois factores diferentes que influenciam a quantidade de água presente no sistema micelar⁶⁸.

A a_w é um parâmetro que pode ser determinado através da equação $a_w = \gamma_w x_w$, em que γ_w é o coeficiente de actividade da água e x_w é a sua fracção molar. Os valores de a_w variam entre 0, para meios completamente secos, e 1, em solventes imiscíveis com a água saturados, ou em solventes miscíveis com a água de tal forma diluídos que a fracção molar da água é virtualmente 1⁶⁸.

O w_0 facilmente calculado através da razão $[H_2O] / [surfactante]$. O parâmetro w_0 caracteriza o grau de hidratação das micelas portanto o tamanho das micelas está directamente relacionado com esta razão⁶⁴.

A variação do parâmetro w_0 a partir do valor mínimo necessário para se obter um sistema micelar estável permite obter diferentes perfis de comportamento para a actividade do biocatalisador^{57, 69}:

1. Curva de saturação, que pode se interpretada como a necessidade de água livre que o enzima tem para obter a actividade máxima^{57, 69};



2. Curva em sino, revelando um pico que corresponde à actividade máxima do biocatalisador e que ocorre habitualmente para valores de w_0 entre 5 e 15^{57, 69};
3. Curva de decréscimo, neste caso a actividade enzimática do biocatalisador diminui continuamente com o aumento do conteúdo de água no sistema de micelas inversas^{57, 69}.

Para a maioria dos biocatalisadores ocorre a curva em sino na representação da actividade enzimática em função do w_0 .

No caso de enzimas encapsuladas parece que o valor óptimo de w_0 aparece linearmente relacionado com o tamanho da proteína, visto que o espaço disponível para o encapsulamento influencia a conformação do enzima no interior da micela. Por exemplo, a hidrogenase da bactéria *Desulfovibri gigas* num sistema de micelas invertidas de AOT apresenta o máximo de actividade para $w_0 = 18$, condição para a qual o tamanho da micela é teoricamente semelhante ao do enzima⁶⁹. No entanto, ainda existem algumas incertezas em relação à dependência da actividade enzimática face ao w_0 ser ou não consequência do tamanho do enzima pois em determinados casos a actividade enzimática varia com o raio dos agregados micelares para além do valor de w_0 óptimo esperado⁶⁹. Estas diferenças poderão estar relacionadas com diferentes localizações do enzima no interior da micela inversa⁶⁹.

O w_0 óptimo também depende da concentração do biocatalisador sendo maior para uma concentração mais elevada⁶⁸.

Estudos feitos às moléculas de água que se encontram no “pool” aquoso mostram que estas apresentam propriedades bastante diferentes das moléculas que se encontram em solução aquosa, o que poderá perturbar a actividade catalítica do biocatalisador encapsulado⁶⁸. De facto uma constante dieléctrica baixa e uma maior viscosidade aumentam as ligações de hidrogénio existentes na estrutura da proteína levando a adquirir uma conformação mais estável⁶⁸.

A estrutura das moléculas de água no interior da micela depende do tamanho da micela à medida que w_0 aumenta verifica-se um aumento na quantidade de água “livre”, ou seja moléculas de água que não se encontram ligadas às cabeças polares do surfactante. Assim sendo aparentemente o tamanho micelar afecta o ambiente aquoso o que, possivelmente, afectará as propriedades catalíticas do enzima⁶⁵.



Outro factor importante na escolha do valor de w_0 óptimo é o tipo de reacção catalisada. Reacções de síntese comparativamente a reacções de hidrólise têm diferentes necessidades de água e isto influenciará o comportamento catalítico do biocatalisador no sistema de micelas invertidas. A disponibilidade de água também tem uma importância determinante na competição entre as reacções de síntese ou de hidrólise ⁶⁸.

A estabilidade do biocatalisador e a solubilidade do substrato, pode influenciar a escolha do w_0 , a concentração do substrato no microambiente da enzima é influenciada pela sua solubilidade, no caso de substratos hidrofílicos é conveniente a utilização de valores de w_0 mais altos ⁶⁸.

Por outro lado uma diminuição na dimensão da esfera aquosa pode levar ao fortalecimento das interacções entre o biocatalisador e o surfactante, no entanto para w_0 muito pequenos o surfactante pode ter um efeito desnaturante sobre o enzima.

Pelo contrário, noutros casos a falta de mobilidade do biocatalisador pode proteger o enzima da desnaturação ⁶⁸. As enzimas em solventes orgânicos mantêm a sua “memória molecular” pois existe pouca água como “lubrificante molecular” ficando cineticamente “presas” na sua conformação inicial⁷². Esta rigidez conformacional previne a desnaturação dos biocatalisadores e conseqüentemente a sua inactivação.

Por todos os factores mencionados, pode concluir-se que fazendo uso do parâmetro w_0 é possível modelar os sistemas de micelas invertidas, influenciando deste modo a actividade, a selectividade e estabilidade do biocatalisador ⁶⁸.

O conceito de w_0 , vulgarmente associado ao nível de hidratação da micela, está estreitamente dependente da concentração de surfactante ⁶⁸. Tal como demonstra a figura 6 o mesmo valor de w_0 pode ser obtido por combinações destas duas variáveis ou seja, se o conteúdo de água e a concentração de surfactante aumentarem, verifica-se que a dimensão das micelas se mantêm mas o seu número aumenta (B) ⁶⁸. Para a mesma concentração de água um aumento da concentração de surfactante, provoca uma diminuição do tamanho do sistema micelar (C), enquanto o aumento da concentração de água, mantendo a concentração de surfactante constante, provoca um aumento do tamanho do sistema de micelas (A). Esta relação mantém-se até que o sistema se torne instável ⁶⁸.

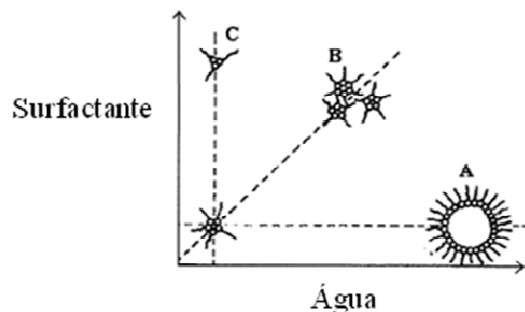


Figura 6- Efeito da quantidade de água e da concentração de surfactante no sistema de micelas invertidas. Adaptado da referência 68.

Resumindo, um aumento na quantidade de surfactante na fase orgânica leva a um aumento da quantidade de biocatalisador solubilizado devido ao aumento no número de agregados que se formam e / ou um aumento no seu tamanho ⁶⁸. O surfactante influencia a quantidade de biocatalisador solubilizado e a sua actividade catalítica bem como a estrutura química da própria micela ⁶⁸. Muitas vezes esta dependência é atribuída a interações entre o biocatalisador e a membrana micelar. O aumento da concentração de surfactante provoca a diminuição da quantidade de substrato disponível para a biocatálise, uma vez que parte do substrato poderá estar em contacto como surfactante devido ao efeito de adsorção ⁶⁸.

No caso do pH, é assumida a ideia de que presença de micelas pode provocar uma alteração no pH óptimo do processo ou da gama de pH em que o biocatalisador é estável. Normalmente o pH referido diz respeito à solução aquosa (tampão) que se adiciona às micelas invertidas ⁷¹. O pH no interior da micela vai depender da carga dos grupos polares das moléculas de surfactante. Assim sendo para surfactante anionicos os valores de pH são baixos enquanto com surfactantes cationicos são obtidos valores de pH mais elevados. Soluções tampão são geralmente usados para constituir a fase aquosa da esfera aquosa, aquando da solubilização do enzima.

A escolha do solvente orgânico está condicionada pela sua compatibilidade com o surfactante e com o biocatalisador ⁶⁸. Alterações no solvente orgânico podem ter efeitos nas propriedades das micelas inversas, tais como a polaridade da interface, o valor máximo de w_0 , bem como na velocidade da reacção, entre outros ⁶⁹. Para além disso, alterações ao nível do solvente orgânico influenciam a distribuição do substrato entre este e a micela ⁶⁹.



Os sistemas de micelas invertidas apresentam características únicas que exigem uma criteriosa selecção das condições óptimas para o encapsulamento do biocatalisador ⁶⁹.

1.8 Estabilidade enzimática

A estabilidade enzimática pode ser definida como a variação da actividade catalítica do biocatalisador ao longo do tempo, pelo que uma fraca estabilidade traduz-se numa rápida perda da actividade enzimática.

Em condições moderadas os enzimas são bons catalisadores em termos de actividade catalítica, selectividade e capacidade de funcionamento. No entanto, a limitada aplicação de enzimas na indústria como biocatalisadores é devida à sua baixa estabilidade operacional nas condições necessárias para determinados processos industriais. Enzimas com interesse para aplicações tecnológicas, devem ser estáveis durante o armazenamento e nas condições operacionais por um longo período de tempo. De um modo geral, para a desactivação dos enzimas a actividade enzimática diminui exponencialmente ao longo do tempo obedecendo ao modelo de decaimento exponencial. Uma representação da actividade residual em função do tempo permite obter a constante de inactivação, K_d . Outro parâmetro importante relacionado com a estabilidade é o tempo de meia-vida, $t_{1/2}$ uma grandeza definida como o tempo para que a actividade residual decresça 50 % do valor inicial ³¹.

A desactivação dos biocatalisadores poderá dever-se a inúmeros factores, como por exemplo, temperaturas elevadas, pH diferente do adequado, ou devido à acção de agentes desnaturantes ou caotrópicos entre outros ⁷³.

1.8.1 Estabilidade enzimática em micelas invertidas

Em condições normais, o enzima apresenta uma estrutura nativa e cataliticamente activa que é mantida através de um balanço de forças não-covalentes: ligações de hidrogénio, iónicas, interacções hidrofóbicas, Van der Waals, etc. Durante a desactivação este conjunto de forças, com excepção das interacções hidrofóbicas, que apenas são significativas acima de 60 °C, diminuem e a macromolécula vai perdendo a estabilidade, isto é, adquire uma conformação mais desordenada. Na estrutura tridimensional nativa



do enzima, o centro activo consiste em diversos aminoácidos próximos entre si. Assim, o desdobraimento da estrutura resulta na desintegração do centro activo, provocando a inactivação do enzima ⁷³.

Alguns enzimas são pouco estáveis à temperatura ambiente, limitando a sua aplicação e dificultando a sua distribuição e uso. Os enzimas podem ser, de um modo geral, armazenadas a -20 °C ou +4 °C, na presença de um estabilizador que pode ser o próprio substrato, de modo a prolongar a sua estabilidade ⁷³. No encapsulamento de biocatalisadores em micelas invertidas a maioria dos enzimas exhibe uma boa estabilidade ⁶⁹.

Na realidade os biocatalisadores quando isolados podem comportar-se de forma diferente do seu ambiente natural “in vivo”. A instabilidade e rápida inactivação podem ser uma consequência da purificação, pois a estabilidade de alguns enzimas depende de associações supramoleculares que existem nas células e mesmo com a água existente no citoplasma da célula. Neste caso, em micelas invertidas o microambiente da esfera aquosa oferece condições favoráveis à estabilidade do biocatalisador pois simula as características da água existente no interior das células, especialmente da água adjacente às membranas biológicas ⁷⁴.

Porém este comportamento pode dever-se a outros efeitos como é o caso do aumento da rigidez conformacional do enzima que é consequência da camada de moléculas de surfactante e/ou do aumento da concentração de substrato no local em que ocorre a reacção ^{57, 69}.

1.9 Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)

Uma das principais características dos sistemas de micelas invertidas é o facto de serem opticamente transparente, mesmo quando o enzima é transferido para o interior do sistema. Deste modo enzimas encapsuladas em meios com um baixo conteúdo de água são possíveis de ser analisados através de estudos espectroscópicos ⁶³.

A grande vantagem da espectroscopia de FTIR para estudos biológicos é que os espectros podem ser obtidos em diversos meios e numa variedade de ambientes, a partir de cristais, soluções aquosas, solventes orgânicos, micelas de detergentes ou membranas de lipídios. Outras vantagens desta técnica são a necessidade de apenas uma pequena



quantidade de proteína com qualquer dimensão e aquisição rápida de dados permitindo medidas em tempo real ^{24,75, 76} .

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na energia das vibrações moleculares e estas vibrações podem ser atribuídas a diferentes grupos químicos como amidas, ácidos carboxílicos ^{75, 77} . O FTIR é uma ferramenta valiosa na caracterização estrutural de diversos materiais biológicos, desde grupos funcionais e estruturas supra moleculares até células intactas ^{24,76} .

Com o desenvolvimento da instrumentação é hoje em dia possível obter espectros de elevada qualidade em soluções aquosas, no entanto devido à elevada absorção da água as bandas da proteína podem ser mascaradas, nestes casos a eliminação total da água da amostra ou a utilização de ²H₂O e solventes orgânicos parece adequada para a obtenção de um espectro de elevada qualidade.

As regiões mais utilizadas nos estudos estruturais de proteínas são a zona da amida I e da amida II que são o reflexo da vibração de grupos específicos do esqueleto da proteína envolvidos na estrutura secundária da proteína ⁷⁵ .

Quanto à zona da amida I localiza-se na gama dos 1600-1700 cm⁻¹ surgindo essencialmente devido ao “stretching” da ligação C=O do esqueleto péptido e uma pequena contribuição da ligação CN. Esta vibração geralmente não é afectada pela natureza das cadeias laterais dependendo essencialmente da estrutura secundária da proteína e, é o modo mais comum para utilizar para estes estudos ⁷⁵ . A vibração da amida I na zona dos 1620-1640 cm⁻¹ pode ser atribuída as folhas- β e na zona dos 1650-1658 cm⁻¹ é atribuída às hélices - α . Estes são os principais constituintes da estrutura secundária das proteínas que podem ser observados na figura 5 ⁷⁵ .

A absorção na zona da amida II localiza-se na gama dos 1500-1600 cm⁻¹ e deve-se essencialmente ao “bending” da ligação N-H ⁷⁵ . Assim, como acontece na zona da amida I as absorções não são afectadas pela natureza das cadeias laterais mas apenas pela estrutura secundária da proteína, no entanto a frequência é mais fraca que no caso da amida I ocorrendo redução na intensidade da banda em ²H₂O e ocorre um desvio na banda para frequências inferiores de aproximadamente 1455 cm⁻¹ ⁷⁵ .

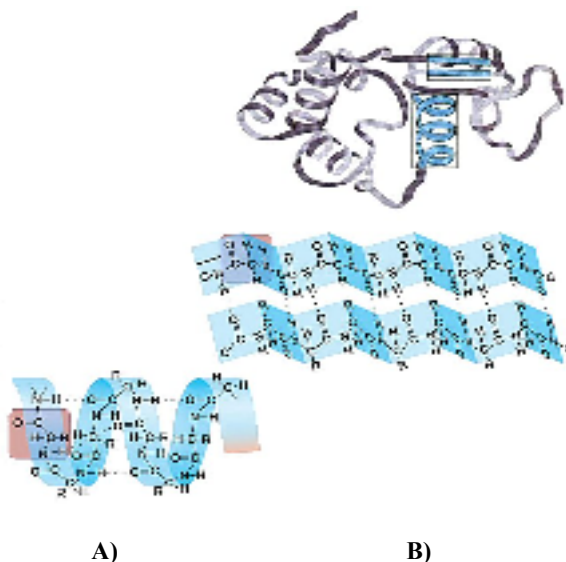


Figura 7- Representação esquemática dos dois tipos de estrutura secundária frequentemente encontrado nas proteínas e enzimas: A) Hélice - α B) Folha- β . Adaptado da referência 78.

Neste trabalho procurou-se desenvolver e otimizar o processo de produção de ácido acetohidroxâmico num sistema de micelas invertidas utilizando como biocatalisador diferentes fontes da amidase de duas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* a L10 e a AI3. O estudo das condições adequadas de actividade catalítica, produtividade e estabilidade do biocatalisador revela-se de importância fundamental para a eficiência e estratégia de desenvolvimento e melhoramento do processo. A avaliação da variação destes parâmetros face a alterações estruturais do biocatalisador encapsulado analisadas por FITR torna-se fundamental na compreensão da relação estrutura/função do biocatalisador quando associado a este processo de produção.

Capítulo II

Materiais e
Métodos



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

O dihidrogenofosfato de potássio, sulfato de amónio, n- heptano, cloreto de ferro e EDTA foram adquiridos na Merck (Estados Unidos da América). O hidrogenofosfato de dipotássio anidro e o sulfato de magnésio constituintes do meio basal foram adquiridos na Carlo Erba (Itália). O ácido láctico foi adquirido na HIMEDIA (Índia) . Acetamida e ácido acetohidroxâmico foram adquiridos na Fluka (Estados Unidos da América), a hidroxilamina na Panreac (Espanha), o Tris e octanol na Riedel – deHaën (Estados Unidos da América). As membranas P-10 para as células de ultrafiltração foram adquiridas na Amicon (Estados Unidos da América). Sepharose 6B, Corante Azul de Comassie G- 250, Éter 1,4-butanedioldiglicidil, TTAB e os marcadores para a electroforese (BSA, Ovalbumina, Urease e Anidrase carbónica, Mioglobina foram adquiridos na Sigma Chemical Company (Estados Unidos da América). Sephacryl S-300 foi adquirida na Ge Healthcare (Suécia). Os restantes reagentes utilizados eram de elevada pureza.

2.2 Métodos

2.2.1 Estirpe bacteriana

As estirpes mutantes L10 e AI3 de *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizadas como fonte de amidase¹².

2.2.2 Produção do biocatalisador

O crescimento das células das estirpes ocorreu a 37 °C com agitação orbital a 250 rpm em meio basal contendo ácido láctico e sulfato de amónio a pH=7,2. Para tal, o meio de cultura foi inicialmente inoculado com células da estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* L10, conservadas em 15 % (v/v) de glicerol, e este pré-inoculo cresceu “overnight” a 37°C. Após este período, meio basal fresco foi inoculado com 10 % (v/v) do pré-inoculo



e as células cresceram a 37 °C. Quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento o que ocorreu a uma A_{540} de 1,3- 1,5, as células foram recolhidas, aproximadamente ao fim de 24 horas de incubação. O mesmo procedimento foi efectuado para células de *Pseudomonas aeruginosa* AI3.

2.2.2.1 Preparação de células intactas de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3

Após o crescimento das cultura, procedeu-se à centrifugação das mesmas durante 20 minutos, a 4 °C e à velocidade de 4648 xg , após o que se rejeitou os sobrenadantes, meios de cultura. Seguidamente procedeu-se à lavagem das células depositadas com soro fisiológico 0,85% (m/v) de NaCl duas vezes por centrifugação a 15500 xg e 4 °C durante 5 minutos. Depois da lavagem as células foram reservadas a -20 °C.

As células congeladas foram ressuspensas em 2 volumes de tampão TMEGB 20mM pH=7,2. Foi determinada a actividade enzimática de amidase e concentração de proteína total para esta suspensão de células.

Parte desta suspensão de células foi reservada para ser utilizada como fonte de biocatalisador (células intactas) e o restante foi utilizado na preparação do extracto celular livre de células para cada uma das estirpes L10 e AI3.

2.2.2.2 Obtenção do extracto celular

As suspensões de células de cada estirpe, reservadas para o extracto celular livre de células, foram sujeitas a desintegração por ultra sons com 5 pulsos de 20 segundos cada a 150 W e centrifugadas a 9840 xg durante 60 minutos a 4 °C, após o que se recolheu o sobrenadante (extracto celular livre de células). A actividade enzimática e concentração de proteína total foram determinadas e o perfil de proteínas presente nestes extractos celulares livres de células avaliado por electroforese PAGE nativa com um gel de resolução de 7,5% .

Parte do extracto celular livre de células foi usado como fonte de amidase na biocatálise e o restante foi reservado e submetido ao processo de purificação da amidase produzida por cada estirpe.



2.2.2.3 Preparação de Sepharose 6B epoxi activada com acetamida

A Sepharose 6B epoxi activada com acetamida como ligando foi utilizada na etapa de purificação da amidase de cada uma das estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* por cromatografia de afinidade uma vez que a acetamida é o substrato por excelência da amidase.

A preparação da resina foi dividida em dois passos: a epoxi-activação da Sepharose 6B com éter 1,4-butanodioldiglicidilo e a posterior ligação da acetamida à resina activada.

A 10 g de Sepharose 6B adicionou-se o mesmo volume de uma solução de NaOH 1N contendo 2 mg/mL de borohidreto de sódio (NaBH_4). Seguidamente adicionou-se igual volume de éter 1,4-butanodioldiglicidilo sobre agitação contínua. Esta mistura de activação foi posteriormente incubada a 30 °C durante 6 horas numa incubadora com agitação orbital a 250 rpm. A resina Sepharose 6B activada foi intensamente lavada com água destilada até se observar o desaparecimento da fase viscosa.

O passo seguinte de ligação da acetamida iniciou-se com a adição de igual volume de uma solução de acetamida 0,5 M em tampão carbonato de sódio 0,2 M a pH=11 e incubação a 30 °C durante dois dias e meio a 150 rpm. Após este período de incubação a resina foi intensamente lavada com água destilada. Os grupos activos epoxi foram bloqueados com uma solução de etanolamina 1 M a pH=9 e incubados durante duas horas a 37 °C e 200 rpm. Os passos finais envolveram uma intensiva lavagem da resina em água destilada, seguida de 500 ml de borato de sódio 0,1M contendo 0,5 M NaCl a pH=8 e de 500 ml de acetato de sódio 0,1 M contendo 0,5 M NaCl a pH=14. A resina preparada foi conservada a 4 °C em dois volumes de azida de sódio 0,01% (m/v).

2.2.2.4 Desnaturação térmica

A estirpe mutante L10 de *Pseudomonas aeruginosa* é termoestável a 60 °C o que permite incluir no processo de purificação da amidase desta estirpe uma etapa prévia de desnaturação térmica. Para este efeito, o extracto celular livre de células da estirpe L10 foi submetido a uma desnaturação térmica à temperatura de 60 °C durante 10 minutos e centrifugado a 9840 xg durante 60 minutos para remoção do precipitado contendo proteínas contaminantes desnaturadas. O sobrenadante contendo amidase, designado por extracto celular desnaturado L10, foi subseqüentemente purificado por duas etapas adicionais de purificação, uma cromatografia de afinidade seguida de filtração em gel.



Foi determinada a actividade enzimática, concentração de proteína total e avaliada a constituição em proteínas desta solução através de uma electroforese PAGE nativa com gel de resolução de 7,5%.

2.2.2.5 Cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi activada com acetamida

O extracto celular livre de células da estirpe AI3 e o extracto celular desnaturado L10 foram utilizados como fonte de amidase L10 e AI3 no processo de purificação deste enzima. Para este efeito o extracto celular desnaturado L10 diluído duas vezes em tampão TMEG 20 mM pH=7,2 foi aplicado em igual volume da resina de Sepharose 6B epoxi activada com acetamida previamente equilibrada. A suspensão foi incubada em agitador circular a 4 °C durante 1 hora, para promover uma melhor interacção entre a resina e o extracto celular desnaturado. De seguida a suspensão foi lavada com tampão TMEG 20 mM pH=7,2 e fracções foram recolhidas até a A_{280} inferior ou igual a 0,05. Após a fase de lavagem, a resina foi empacotada numa coluna e iniciou-se a eluição aplicando um gradiente linear crescente no mesmo tampão TMEG 20mM pH=7,2 de 0 a 40:40 mM de acetamida:hidroxilamina. As fracções recolhidas foram avaliados em termos de A_{280} e actividade enzimática de amidase de acordo com o procedimento descrito em Brammar and Clarke (1964) ⁷⁹.

As fracções contendo maior actividade de amidase o que se traduz pela maior A_{490} do complexo castanho formado foram reunidas num “pool” de cromatografia de afinidade e submetidas a uma etapa do processo de purificação por filtração em gel. Foi determinada a actividade enzimática, concentração de proteína total e avaliada a pureza desta solução através de uma electroforese PAGE nativa com um gel de resolução de 7,5%.

O procedimento descrito foi executado da mesma forma para a purificação por cromatografia de afinidade do extracto celular da estirpe *Pseudomonas aeruginosa* AI3.

2.2.2.6 Cromatografia de Filtração em gel

De modo a obter um elevado grau de pureza nas soluções de enzima L10 e AI3 foi necessário efectuar uma etapa adicional de purificação por filtração em gel em Sephacryl S-300.



Neste caso as soluções de enzima provenientes da cromatografia de afinidade foram concentradas por ultrafiltração à pressão de 2 atm e à temperatura de 4 °C usando uma membrana P-10. Seguidamente efectuou-se a filtração em gel na resina Sephacryl S-300 empacotada numa coluna e equilibrada com tampão TME 20 mM pH=7,2.

A solução de amidase L10 previamente concentrada contendo 10 % de glicerol foi aplicada e o enzima foi eluído a um caudal de 20 ml/h. De modo a averiguar a presença da amidase nas fracções recolhidas foi registada sua A_{280} e a sua actividade enzimática foi quantificada pelo método já descrito em **2.2.2.5**.

As fracções contendo maior actividade de amidase foram reunidas e designadas de “pool” da filtração em gel constituindo a solução de amidase L10 purificada. A actividade enzimática e concentração de proteína total desta solução foram determinadas e a sua pureza avaliada por electroforese PAGE nativa com um gel de resolução de 7,5% .

O mesmo procedimento foi executado para a solução de amidase AI3 concentrada proveniente da cromatografia de afinidade do extracto celular da estirpe *Pseudomonas aeruginosa* AI3, neste caso o “pool” da filtração em gel foi designado solução de amidase AI3 purificada.

2.2.2.7 Doseamento de proteína total e Análise electroforética

De modo a avaliar o rendimento e a pureza das soluções contendo amidase durante o processo de purificação determinou-se a concentração de proteína e efectuou-se uma análise electroforética das soluções obtidas durante as diferentes etapas de purificação para ambas as estirpes.

A determinação da concentração de proteína das células intactas, no extracto celular livre de células, no extracto celular desnaturado, no “pool” de afinidade e na solução de amidase purificada foi feita com base no método de ligação do Corante Azul de Coomassie usando BSA como proteína de referência ⁸⁰. A quantidade de proteína em cada amostra foi determinada a partir de uma curva de calibração de soluções de BSA com diferente concentração em função da A_{655} do complexo formado entre a proteína e o corante . A curva de calibração obtida foi a seguinte:

$$A_{655} = 0,0022 C_{\text{proteína}} (\mu\text{g/ml}) + 0,0022 (R^2=0,9768) \text{ (Figura 1 do Capítulo VI) .}$$



As soluções contendo amidase obtidas ao longo das diferentes etapas do processo de purificação (20 µg) foram sujeitas a electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-Nativa) em condições nativas usando um gel de resolução de 7,5% segundo o método descrito por Hames e Rickwood⁸¹.

Foi utilizado um sistema de electroforese de mini-géis (8,3 x 7,3 cm) e como marcadores de massa molecular conhecida, as proteínas padrão: Urease (272 000 Da), BSA (132000 Da e 66000 Da), Ovalbumina (45000 Da), Anidrase carbónica (29 000 Da) e Mioglobina (17800 Da).

Após a corrida electroforética o gel foi corado com nitrato de prata por um método adaptado de Sasse e Gallagher⁸² de modo a avaliar a pureza destas soluções.

2.2.2.8 Ensaio enzimáticos

De modo a averiguar as fracções que continham amidase utilizou-se um método simples e rápido num sistema de microplacas para detectar a formação do acetohidroxamato, o produto da actividade de transferase do enzima⁷⁹. Para tal foi efectuada uma mistura reaccional para cada fracção recolhida da cromatografia que contém igual volume de tampão Tris 150 mM pH=7, hidroxilamina 2 M pH=7 e fracção. A reacção foi iniciada com a adição de igual volume de 400 mM de acetamida e incubada a 37 °C durante 15 minutos. A quantidade de ácido acetohidroxâmico na mistura reaccional ao fim de 15 minutos foi detectada por adição de 10 µl da mistura a 100 µl de FeCl₃ 6 % (m/v) em HCl 2 % (m/v) e registada a A₄₉₀.

Na quantificação da actividade enzimática da amidase presente durante o processo de purificação nas células intactas, no extracto celular livre de células, no extracto celular desnaturado, no “pool” de afinidade e na solução de amidase purificada utilizou-se um método descontínuo para avaliar a velocidade de síntese do ácido acetohidroxâmico pelo enzima. A mistura reaccional é constituída por igual quantidade de tampão Tris-HCl 150 mM pH=7, hidroxilamina 2 M pH=7 e amostra contendo amidase. A reacção foi iniciada com igual quantidade de acetamida 400 mM. A velocidade de formação do ácido acetohidroxâmico foi avaliada por quantificação do produto formado em tomas de 10 µl retiradas da mistura reaccional a vários intervalos de tempo durante 20 minutos adicionadas a 100 µl de uma solução de FeCl₃ 6 % (m/v) em HCl 2% (m/v). A velocidade de síntese do produto foi determinada pela quantificação do complexo



castanho que absorve a 490 nm ao longo do tempo da reacção. Uma unidade de actividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de ácido acetohidroxâmico por minuto nas condições da reacção.

A quantidade ácido acetohidroxâmico presente na mistura reaccional foi determinada usando uma curva de calibração de soluções de ácido acetohidroxâmico com concentrações conhecidas versus a A_{490} de 100 μl de uma solução de FeCl_3 6 % (m/v) em HCl 2% (m/v) à qual foi adicionada 10 μl de cada uma das soluções de ácido acetohidroxâmico previamente diluída numa proporção de 1:4 tampão Tris - HCl 150 mM. Desta curva de calibração determinou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) para o complexo castanho formado de $0,021 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($R^2 = 0,9971$) (Figura 2 do Capítulo VI).

2.2.3 Estudo da reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico

De forma a avaliar o rendimento da reacção de síntese de ácidos hidroxâmicos pela amidase quando imobilizada em micelas invertidas face à reacção em solução aquosa foi estudado o efeito do encapsulamento do biocatalisador e do conteúdo em água na actividade enzimática do enzima quando purificada, em células intactas ou no extracto celular da estirpe L10 e AI3 de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.3.1 Sistema de micelas invertidas

Os sistemas de micelas invertidas foram preparados por injeccção. A solução contendo o biocatalisador (células intactas, extracto celular livre de células ou solução de amidase purificada) foi introduzida num sistema de micelas invertidas formadas pelo tensoactivo TTAB em heptano/octanol 80/20 (v/v). Este sistema foi preparado por injeccção de 15 mM de hidroxilamina e de 30 μl da solução contendo enzima em 5 ml de TTAB 200 mM numa mistura de heptano/octanol 80/20 (v/v) sob agitação constante.

A acetamida em tampão TMEG 20 mM pH= 7,2 foi injectada, sob agitação constante, nesta mistura com uma concentração final de 7,5 mM, de modo a iniciar a reacção. O conteúdo de água no sistema, definido através do parâmetro $w_0 = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{surfactante}]$, foi controlado ajustando o volume de tampão TMEG 20 mM pH= 7,2 adicionado nos sistemas de micelas de modo a variar os valores de w_0 estudados.



A actividade de transamidação da amidase presente nos diferentes sistemas de micelas invertidas formados, foi determinada por quantificação do acetohidroxamato formado nesta mistura reaccional de micelas invertidas durante a reacção.

2.2.3.2 Solução aquosa

A reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico foi estudada para as diferentes soluções contendo amidase em solução aquosa, utilizando a 15 mM de hidroxilamina e 7,5 mM de acetamida como substratos, em tampão TMEG 20 mM pH=7,2. A actividade da amidase presente nas células intactas, extracto celular livre de células ou solução de amidase purificada para as duas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3 foi determinada para a mesma quantidade de enzima que em micelas invertidas.

2.2.4 Ensaio enzimáticos

A actividade enzimática da amidase encapsulada em micelas invertidas, sob a forma de células intactas, extracto celular livre de células ou solução de amidase purificada, foi quantificada pela determinação da velocidade de síntese do ácido acetohidroxâmico na mistura reaccional ⁷⁹.

A velocidade de formação do ácido acetohidroxâmico foi avaliada por quantificação do produto formado em tomas de 400 µl retiradas da mistura reaccional a vários intervalos de tempo durante 35 minutos e adicionadas a 800 µl de uma solução de FeCl₃ 6 % (m/v) em HCl 2% (m/v). A velocidade de síntese do produto foi determinada pela quantificação do complexo castanho que absorve a 490 nm ao longo do tempo da reacção. Uma unidade de actividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de ácido acetohidroxâmico por minuto nas condições da reacção.

O mesmo procedimento foi executado para diferentes misturas reaccionais em solução aquosa contendo células intactas, extracto celular livre de células ou solução de amidase purificada.

A quantidade de ácido acetohidroxâmico presente na mistura reaccional, em dado instante da reacção, foi determinada recorrendo a curvas de calibração de acetohidroxamato em micelas invertidas e em solução aquosa.



Deste modo usaram-se soluções de micelas invertidas de TTAB 200 mM em heptano/octanol 80/20 (v/v) contendo diferentes concentrações de ácido acetohidroxâmico. A curva de calibração foi construída para diferentes concentrações de acetohidroxamato em função da A_{490} da mistura de 400 μl destas soluções com 800 μl de uma solução de FeCl_3 6 % (m/v) em HCl 2% (m/v). Desta curva de calibração determinou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) para o complexo castanho formado de $0,0889 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($R^2= 0,9936$) (Figura 3 do Capítulo VI).

Quanto à curva de calibração de acetohidroxamato em solução aquosa foi determinada de modo semelhante excepto que as soluções de concentração conhecida de ácido acetohidroxâmico foram preparadas em tampão TMEG 20 mM pH=7,2. Desta curva de calibração determinou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ) de $0,0828 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($R^2= 0,994$) (Figura 4 do Capítulo VI).

2.2.5 Estudo da estabilidade do biocatalisador ao longo do tempo

De modo a determinar o efeito do encapsulamento nas células intactas, extracto celular livre de células ou da amidase purificada de cada uma das estirpes foi avaliada a sua estabilidade no armazenamento comparativamente à estabilidade em solução aquosa.

Quanto à estabilidade em micelas invertidas, as soluções contendo amidase foram encapsuladas em 200 mM de TTAB em heptano/octanol 80/20 (v/v) a um w_0 constante de 10 e incubadas a 24 °C sob agitação constante. A actividade enzimática do enzima encapsulado foi determinada durante vários dias injectando em aliquotas da mistura inicial 15 mM de hidroxilamina e 7,5 mM de acetamida em TMEG 20 mM pH 7,2 de modo a dar início à reacção. A quantificação da actividade enzimática foi executada pelo método descrito.

De modo semelhante este estudo foi feito em solução aquosa, mas neste caso as soluções contendo amidase foram reservadas durante vários dias em tampão TMEG 20 mM pH 7,2. A actividade enzimática da amidase foi determinada durante este período de tempo de armazenamento pela adição de 15 mM de hidroxilamina e 7,5 mM de acetamida em TMEG 20 mM pH 7,2, de modo a dar início à reacção, em tomas da solução inicial.



O decaimento da actividade enzimática do biocatalisador em micelas invertidas e em solução aquosa ao longo do tempo de armazenamento permitiu calcular o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para a amidase de ambas as estirpes nestas condições.

2.2.6 Espectroscopia de infravermelhos por transformadas de Fourier (FTIR)

O efeito do encapsulamento num sistema de micelas invertidas na estrutura das amidases de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e A13 foi estudado, para as várias condições de w_0 testadas, utilizando espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR).

Preparam-se diferentes soluções de 200 mM TTAB em 5 ml de heptano/octanol 80/20 (v/v) contendo 30 μ l de solução de enzima purificada. Foi injectada uma quantidade de $^2\text{H}_2\text{O}$ de modo a ajustar o valor de w_0 pretendido. A $^2\text{H}_2\text{O}$ foi utilizada de modo a obter espectros sem bandas de interferência na região das amidas de interesse.⁸¹ De modo semelhante registaram-se os espectros de FTIR para a mesma quantidade de enzima em solução aquosa de 5 ml $^2\text{H}_2\text{O}$.

Os espectros de infravermelho foram registados usando um espectrómetro Tensor 27 da Bruker com uma resolução de 4 cm^{-1} e foram efectuados 400 varrimentos numa gama de absorção de 400-4000 cm^{-1} de modo a obter espectros com uma elevada razão S/N (sinal/ruído) de 40 μ l da mistura a analisar numa célula de CaF_2 .

Capítulo III

Discussão de
Resultados



3 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1 Purificação das amidases L10 e AI3

A purificação da amidase L10 e AI3 produzida respectivamente pelas estirpes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3 foi efectuada recorrendo a um procedimento envolvendo diversos passos. Os resultados estão resumidos na Tabela 1 e 2.

Etapas de purificação	Concentração (mg/ml)	Proteína (mg)	Actividade total (UI)	Actividade específica (UI/mg proteína)	Rendimento actividade enzimática (%)	Factor Purificação
Extracto celular	28,9	115,60	1023,24	8,85	100	1
Extracto celular desnaturado	14,8	44,45	711,43	16,00	69,53	1,81
Eluído da coluna de afinidade	1,23	16,79	350,08	20,85	34,21	2,36
Eluído da coluna de filtração em gel	0,09	8,60	242,14	28,15	23,66	3,18

Tabela 1- Purificação da amidase da estirpe mutante L10 de *Pseudomonas aeruginosa* por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi activada com acetamida seguida de filtração em gel em Sephacryl S-300. Durante o processo de purificação a quantificação de proteína e doseamentos de actividade enzimática foram executados de acordo com os Materiais e Métodos.

Etapas de purificação	Concentração (mg/ml)	Proteína (mg)	Actividade total (UI)	Actividade específica (UI/mg proteína)	Rendimento actividade enzimática (%)	Factor Purificação
Extracto celular	24,01	48,02	561,90	11,70	100	1
Eluído da coluna de afinidade	0,29	3,61	452,38	125,19	80,51	10,70
Eluído da coluna de filtração em gel	0,02	1,66	302,14	181,62	53,77	15,52

Tabela 2- Purificação da amidase da estirpe mutante AI3 de *Pseudomonas aeruginosa* por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi activada com acetamida seguida de filtração em gel em Sephacryl S-300. Durante o processo de purificação a quantificação de proteína e doseamentos de actividade enzimática foram executados de acordo com os Materiais e Métodos.



De acordo com a Tabela 1, a amidase L10 foi purificada aproximadamente 3 vezes a partir do extracto celular e com um rendimento de aproximadamente 24 %. O comportamento cromatográfico do enzima e o perfil de eluição da amidase L10 na cromatografia de afinidade e na filtração em gel encontra-se representado nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

O objectivo nesta fase consistiu em utilizar um procedimento de purificação que se revelasse eficiente e rápido permitindo, ainda assim, obter uma solução de amidase com considerável grau de pureza e homogénea. O baixo rendimento obtido para a purificação da amidase L10 foi consequência da necessidade de uma solução de amidase purificada. O rendimento de um processo de purificação está dependente da quantidade de proteína existente na amostra à partida e do número de etapas utilizadas na purificação. Como é sabido, em cada passo ocorrem sempre perdas e como tal, o número de passos para a purificação deverá ser mínimo. No entanto, neste caso, verificou-se que um único passo de purificação não seria suficiente para que o enzima obtido demonstrasse um elevado grau de pureza. Deste modo sacrificou-se o rendimento do processo para a obtenção de uma solução de amidase L10 de elevado grau de pureza e aparentemente homogénea.

Na cromatografia de afinidade a amidase L10 foi ligada à resina Sepharose 6B epoxi activada com acetamida, no entanto durante a etapa de lavagem ocorreram perdas de amidase o que contribuiu para uma diminuição do rendimento, nomeadamente nas fracções 1 e 2 como pode ser observado na Figura 1. A amidase L10 foi posteriormente eluída com um gradiente linear da acetamida e hidroxilamina para a concentração de 40:40 mM e foram reunidas as fracções 11 a 17 constituindo uma solução de amidase designada por “pool” de afinidade. Dos vários gradientes lineares testados o de 0 a 40:40 mM de acetamida:hidroxilamina foi o que revelou resultados mais satisfatórios.

De facto, apesar da etapa de desnaturação térmica e de cromatografia de afinidade, a que foi sujeito o extracto celular livre de células, ter removido boa parte das proteínas contaminantes ainda era notória alguma contaminação da solução de amidase, dado o baixo factor de purificação, cerca de 2. A Figura 3 ilustra o perfil de proteínas das soluções contendo amidase durante o processo de purificação tornando evidente no



poço 3 a presença de proteínas contaminantes na solução de amidase obtida por cromatografia de afinidade.

Uma etapa de cromatografia de filtração em gel permitiu obter uma elevada pureza da solução de amidase, como pode ser constatado no poço 4 da Figura 3. A solução de enzima obtida por cromatografia de afinidade foi concentrada e aplicada numa coluna de filtração em gel empacotada com resina Sephacryl S-300. A filtração em gel permite uma separação baseada em diferenças de dimensão dos componentes da amostra. Pode ser verificado no perfil de eluição da Figura 2 um pico de A_{280} para a fracção 20, no entanto essas fracções foram rejeitadas visto não apresentarem actividade enzimática, o que poderia ser indicativo da presença de proteínas contaminantes de menor dimensão que a amidase. Somente as fracções 34 a 38 foram seleccionadas, dado a sua elevada actividade específica, para constituir a solução de amidase L10 purificada designada por “pool” de filtração em gel.

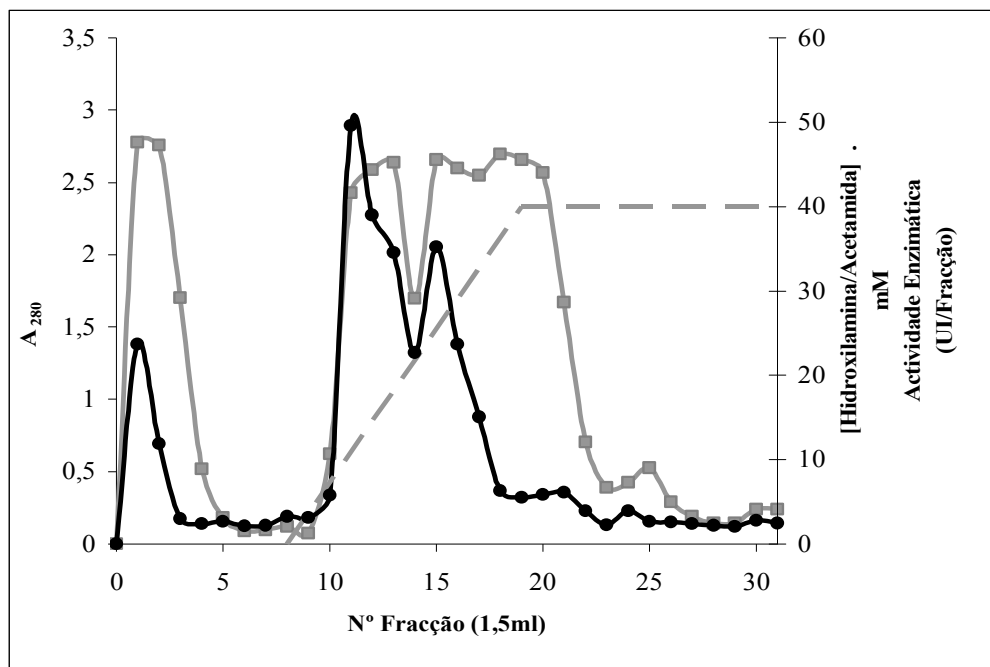


Figura 1- Perfil cromatográfico da purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi-activada com acetamida. A amidase foi eluída da coluna com um gradiente linear de 0 a 40:40 mM acetamida: hidroxilamina pH=7 (A_{280} representada por linha cinzenta; linha interrompida a cinzenta representa o gradiente de concentração de acetamida/hidroxilamina; Actividade da amidase representada por linha preta.)

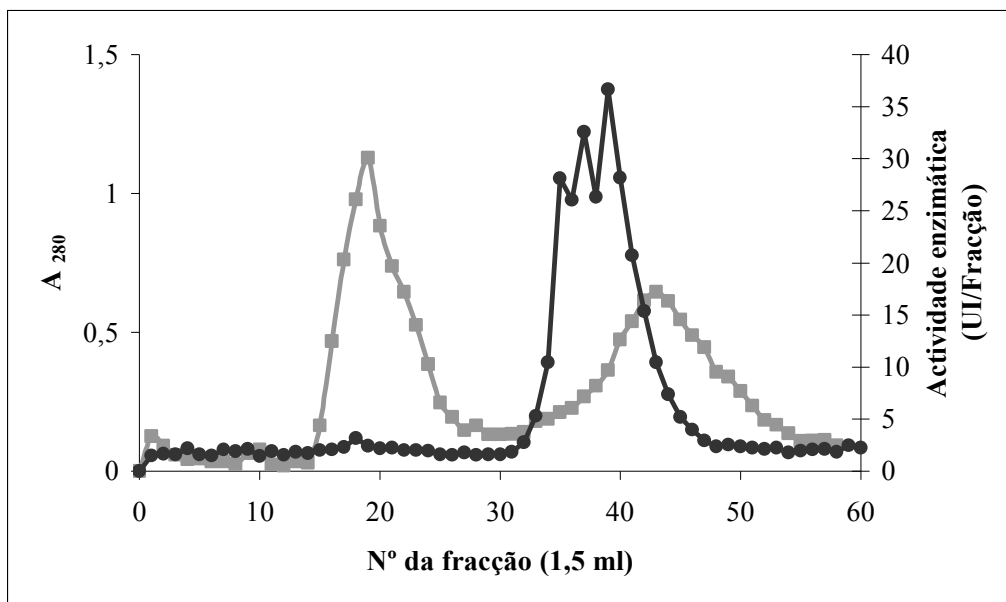


Figura 2- Perfil cromatográfico da purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 por filtração em gel em Sephacryl S-300 da solução de enzima obtida após a cromatografia de afinidade (linha a preto representa a Actividade da amidase e a linha a cinzento representa a A_{280})

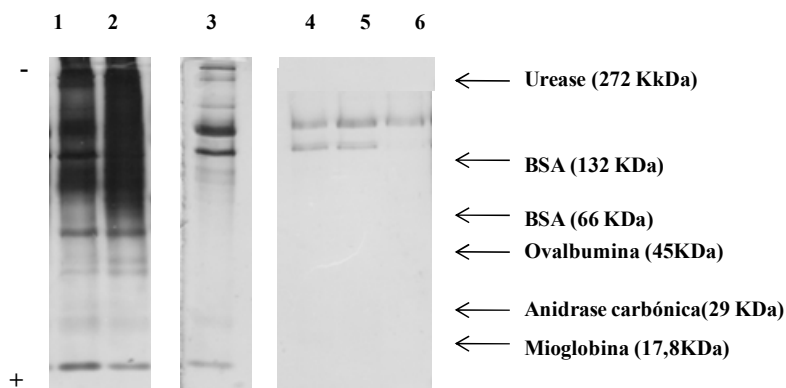


Figura 3- PAGE-Nativa das diferentes etapas do processo de purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 usando um gel de resolução de 7,5 %. Os poços contêm 20 μ g de:

- 1) Extracto celular desnaturado;
- 2) Extracto celular;
- 3) “pool” de afinidade;
- 4, 5 e 6) “pool” de filtração em gel.

Quanto à amidase da estirpe mutante de *Pseudomonas aeruginosa* AI3, o enzima foi purificada usando o processo de purificação ilustrado na Tabela 2 com um rendimento de aproximadamente 54 % e um factor de purificação de 16, indicando que a amidase AI3 foi purificada cerca de 16 vezes a partir do extracto celular.



As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, o comportamento cromatográfico da amidase da estirpe mutante AI3 de *Pseudomonas aeruginosa* durante a purificação por cromatografia de afinidade numa coluna de resina Sepharose 6B epoxi activada com acetamida seguida por uma cromatografia de filtração em gel, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Na análise da Figura 4 foram seleccionadas e reunidas as fracções 22 a 27 num “pool” de afinidade resultante da eluição da amidase à concentração de 40:40 mM de acetamida:hidroxilamina, constituindo uma solução contendo amidase AI3. No perfil de eluição da Figura 4 foram verificados dois picos de A_{280} para a fracções 20 e 27 que apresentaram actividade enzimática o que faz prever a existência de duas variantes do enzima difíceis de separar recorrendo somente a esta técnica cromatográfica. No entanto, este gradiente de 0 a 40:40 mM de acetamida:hidroxilamina revelou resultados mais satisfatórios face aos vários gradientes lineares testados.

A PAGE nativa da Figura 6 (poço 2) que ilustra o perfil de proteínas obtido na solução contendo amidase AI3 obtida da cromatografia de afinidade, permitiu constatar que esta solução se encontrava pouco homogénea revelando inúmeras proteínas, para além da amidase AI3.

Um passo adicional ao processo de purificação por cromatografia de filtração em gel em Sephacryl S-300 revelou bons resultados como passo final do processo. Deste modo o “pool” de afinidade foi concentrado e aplicado numa coluna de filtração em gel empacotada com resina Sephacryl S-300. Por análise do perfil cromatográfico da Figura 5, obtido na filtração em gel, foram reunidos várias fracções e constituídos três “pools” correspondentes a três picos de actividade enzimática no cromatograma indicando possivelmente variantes do enzima agregados ou degradados que, no entanto, demonstravam actividade enzimática. Destas preparações purificadas de amidase que foram analisados por PAGE nativa em gel de resolução 7,5 % , aparentemente apenas a solução de amidase purificada separada por electroforese no poço 3 (Figura 6), correspondendo às fracções de eluição 20 a 23, apresentou-se como mais homogénea manifestando um factor de purificação de 16 e representa a solução de amidase AI3 purificada.



O perfil de proteínas das soluções de amidase obtidas durante as etapas de purificação foi obtido por PAGE nativa e pode ser observado nas Figuras 3 e 6 respectivamente para a purificação da amidase L10 e AI3. Em ambos os casos é visível uma significativa diminuição do número de proteínas presentes do extracto celular livre (poço 2 e 1 respectivamente) comparativamente às soluções de amidase obtidas durante o processo de purificação e a homogeneidade das soluções de amidase L10 e AI3 purificada, respectivamente no poço 3 da Figura 3 e no poço 3 da Figura 6. A solução contendo amidase L10 é aparentemente pura e homogênea uma vez que se verifica apenas a existência de uma única banda de proteína. No caso da amidase AI3 observou-se a existência de mais de uma proteína na solução purificada do enzima, mas que aparentam ser variantes da amidase AI3 visto apresentarem actividade enzimática. O cálculo de Mr das proteínas representadas por estas bandas, em cada um dos casos, permitiu concluir que estas correspondiam à amidase.

No caso da amidase L10, a determinação de uma de Mr de 158 KDa da única banda observada no poço 3 da Figura 3 foi efectuada com base na curva de calibração da Figura 7. A curva de calibração da Figura 7 representa o logaritmo da massa molecular relativa dos marcadores (assinalados com uma seta no lado direito das Figuras 3 e 6) em função da mobilidade relativa (Rf) das bandas correspondentes e cuja equação é: $\text{Log Mr} = -1,7947 \text{ Rf} + 2,5688$ ($R^2 = 0,9532$). No entanto, a determinação da massa molecular relativa das proteínas recorrendo à PAGE nativa não é rigorosa e desvios na massa molecular podem ser explicados pelo facto de a separação ocorrer em função da carga e da massa. Apesar da massa molecular relativa da amidase ser aproximadamente 230 KDa, em PAGE nativa esta assume um valor aproximado de 148 KDa⁶, o que se verificou neste caso.

Para a amidase mutante AI3 as bandas existentes no poço 3 da Figura 6 permitiram a determinação dos seguintes valores para as suas massas moleculares relativas: 132,125, 118, 99 e 37,3 KDa. No entanto a banda mais intensa corresponderá à amidase AI3 cuja massa molecular relativa corresponde tal como no caso da amidase L10 à massa molecular que o enzima exhibe em PAGE nativa⁶. No caso da banda de proteína mais ténue presente no poço 3 da Figura 6 com uma massa molecular relativa de 37,3 kDa, esta diz respeito à subunidade da amidase que também se obtém na forma desnaturada.

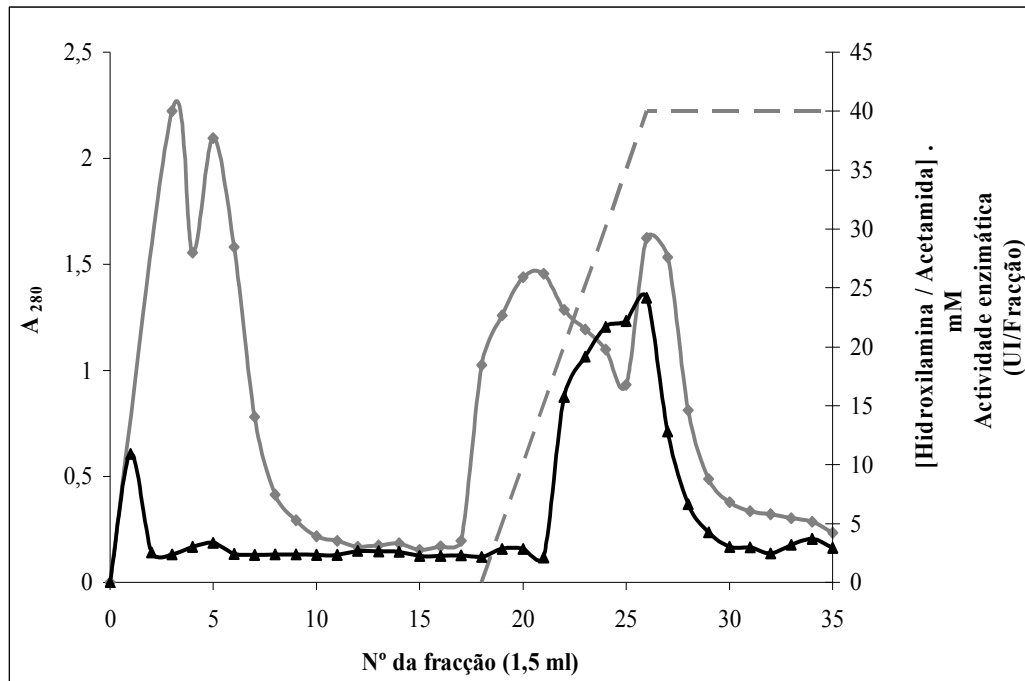


Figura 4- Perfil cromatográfico de purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 por cromatografia de afinidade em Sepharose 6B epoxi-activada com acetamida. A amidase foi eluída da coluna com um gradiente linear de 0 a 40:40 mM acetamida: hidroxilamina pH=7 (A_{280} representada por linha preta a cheio; linha interrompida a cinzento representa o gradiente de concentração de acetamida/hidroxilamina; Actividade da amidase representada por linha cinzenta a cheio.)

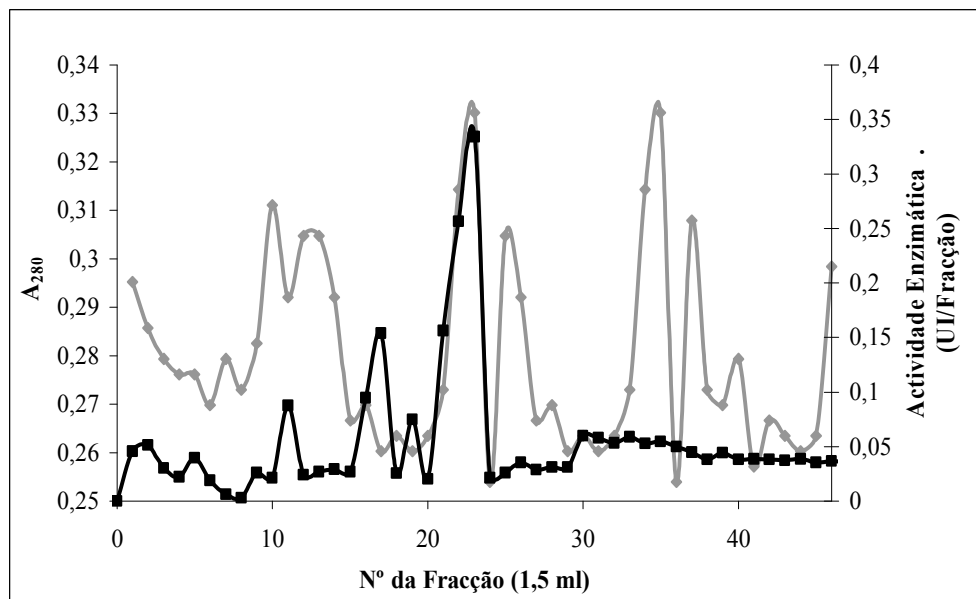


Figura 5- Perfil cromatográfico de purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 por filtração em gel em Sephacryl S-300 da solução de enzima obtida após a cromatografia de afinidade (linha a preto representa a A_{280} e a linha a cinzento representa a Actividade da amidase)

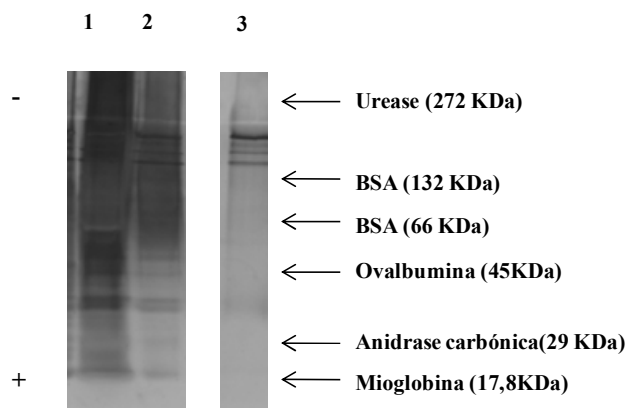


Figura 6-PAGE-Nativa das diferentes etapas do processo de purificação da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 usando um gel de resolução de 7,5 %. Os poços contém 20 µg de: 1) Extracto celular; 2) “pool” de afinidade ; 3) “pool” de filtração em gel ”.

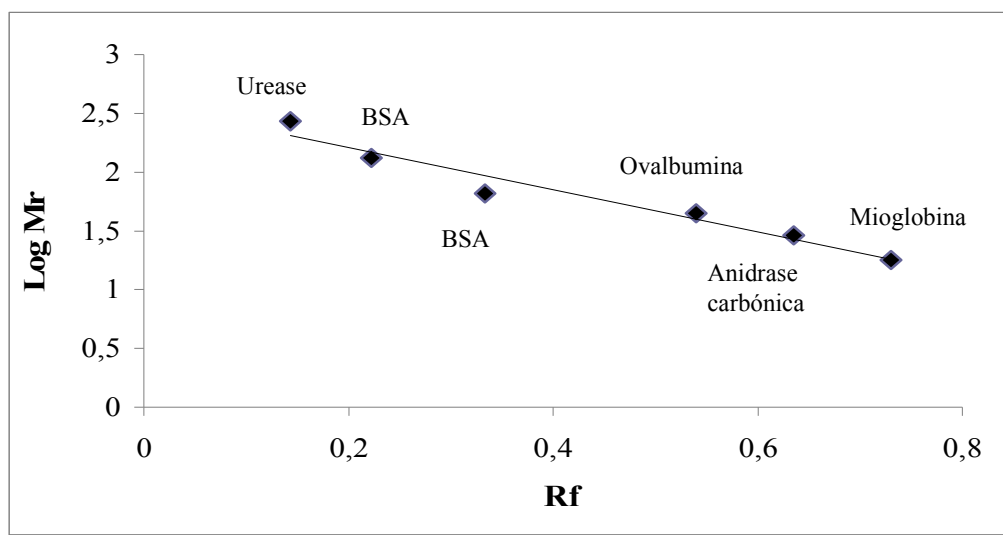


Figura 7- Determinação da massa molecular relativa das subunidades da amidase por PAGE nativa em gel de resolução de 7.5 % a partir da Figura 3 e 6. As fracções contendo amidase e os padrões foram colocados no mesmo gel. Os marcadores de massa molecular conhecida esquematizados nas Figuras pelas setas são: Urease (252KDa); BSA (132 KDa- dímero, 66 KDa-monómero); Ovalbumina (45 KDa); Anidrase carbonica (29 KDa); Mioglobina (17.8 KDa).

3.2 Biocatalisador em micelas invertidas

O estudo comparativo entre a actividade enzimática da amidase em solução aquosa e a actividade do enzima quando encapsulado num sistema não convencional de micelas invertidas foi efectuada. Tendo por base a reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico



catalisada por este enzima, supõe-se que em micelas invertidas esta reacção deverá ser privilegiada em relação à reacção de hidrólise de amidas que, por seu lado, ocorrerá tendencialmente em solução aquosa ⁴⁶. De acordo com o esquema da Figura 8, a água compete com a hidroxilamina como aceitador de grupos acilo, no caso do enzima encapsulada a água disponível para a reacção de hidrólise será mínima, o que favorecerá a reacção de transferase assinalada com*.

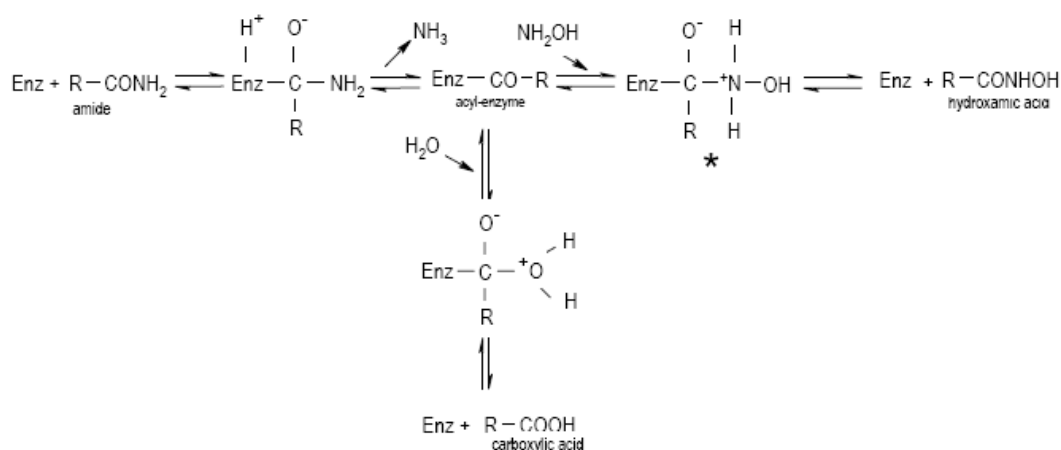


Figura 8-Esquema das reacções catalisadas pela amidase na reacção de transferência do grupo acilo para a água (reacção de hidrólise) ou para a hidroxilamina (reacção de transaminação), assinalada com *, com formação do ácido hidroxâmico.

Nas micelas invertidas o parâmetro w_0 caracteriza o grau de hidratação das micelas sendo facilmente calculado através da razão $[H_2O]/[surfactante]$ sendo que o tamanho das micelas depende desta razão. Em relação ao sistema de micelas invertidas fez-se variar o w_0 entre 3,5 e 11,5 e determinou-se a actividade enzimática da amidase na reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico. Este estudo foi feito encapsulando uma solução contendo amidase L10 em micelas invertidas quer sobre a forma de células intactas, de extracto celular livre de células ou de amidase pura e os resultados obtidos nas várias condições estudadas são apresentados na Figura 9. O mesmo tipo de análise foi efectuada para soluções contendo a amidase AI3 e neste caso os resultados estão esquematizados na Figura 10.

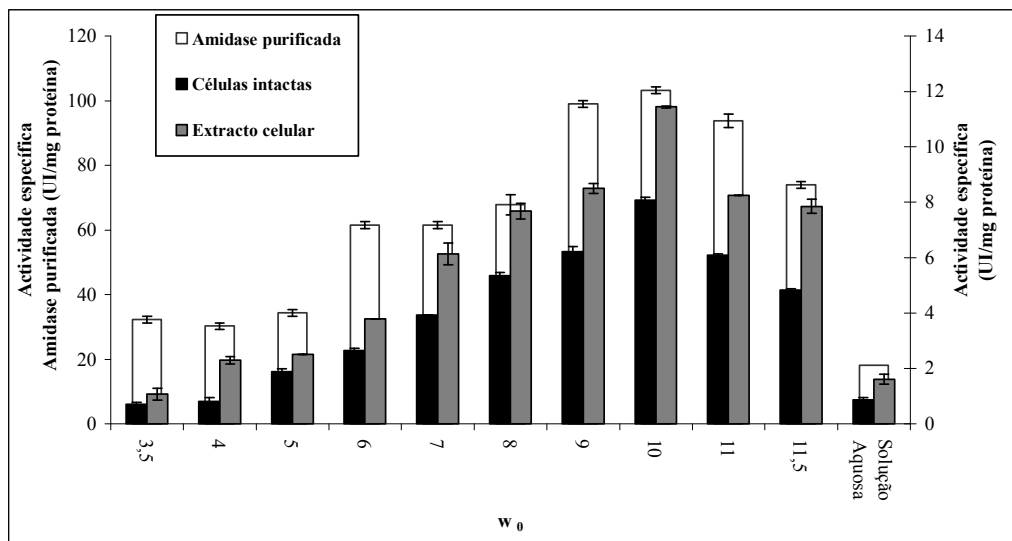


Figura 9- Efeito do conteúdo micelar em água na actividade de síntese de ácido acetohidroxâmico por células de *Pseudomonas aeruginosa* L10 (preto), extracto celular livre de células (cinza) e solução de amidase L10 purificada (branco). As condições da reacção estão descritas nos Materiais e Métodos.

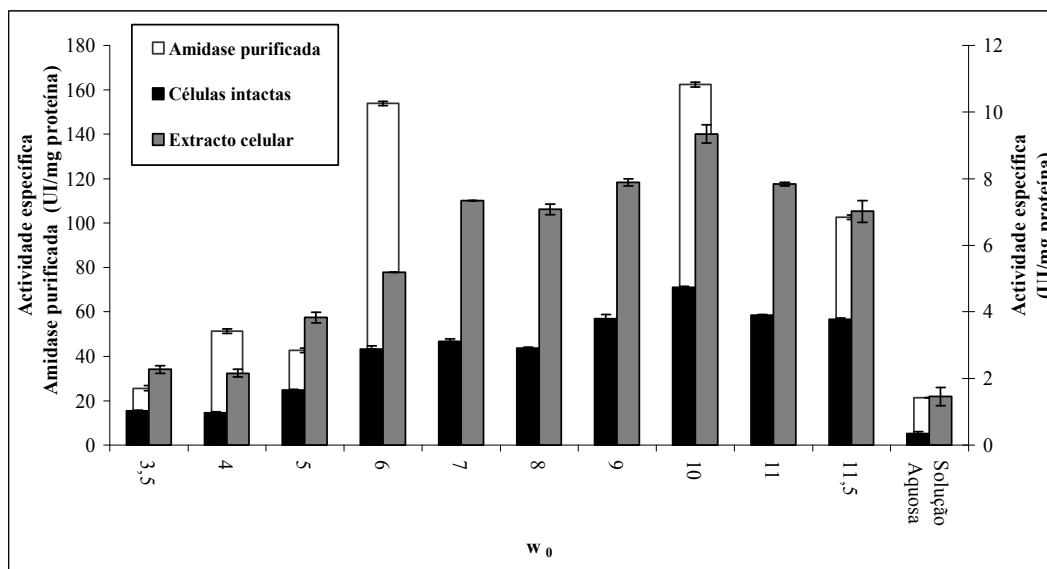


Figura 10- Efeito do conteúdo micelar em água na actividade de síntese de ácido acetohidroxâmico por células de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 (preto), extracto celular livre de células (cinza) e solução de amidase AI3 purificada (branco). As condições da reacção estão descritas nos Materiais e Métodos.

Os resultados obtidos revelam uma tendência em forma de sino com um máximo de actividade enzimática a $w_0=10$ para ambas as estirpes sendo esta curva em forma de sino é mais pronunciada para a estirpe L10 que para a estirpe AI3. Verifica-se também que a maior actividade específica é obtida para a solução de amidase purificada



comparativamente com o extracto celular livre de células e deste relativamente às células intactas em ambas as estirpes. O facto de as células intactas apresentarem a menor actividade específica poderá dever-se a resistências difusionais que ocorrem no transporte do substrato da solução no microambiente no interior da micela invertida para o centro catalítico do enzima ³¹. Este efeito é mais notório no caso das células intactas, nas quais o biocatalisador está protegido no interior da célula bacteriana, dando origem a actividades específicas mais baixas. No entanto, todas as soluções contendo biocatalisador evidenciaram êxito na utilização da amidase na catálise de reacções de síntese do ácido acetohidroxâmico no interior das micelas invertidas especialmente para um w_0 de 10, obtendo-se a maior actividade de síntese de ácido acetohidroxâmico para a amidase purificada de AI3.

A capacidade do biocatalisador catalisar a reacção de síntese de ácido acetohidroxâmico em solução convencional aquosa foi também avaliada e comparada com a síntese em micelas invertidas.

Como se pode observar pelos resultados obtidos a actividade enzimática da amidase na reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico é inferior em meio convencional aquoso em relação ao sistema de micelas invertidas, uma vez que o elevado conteúdo de água no meio provavelmente favorece a ocorrência da reacção de hidrólise em detrimento da reacção de transaminação. Os resultados obtidos estão de acordo com o publicado na literatura⁴⁶ e traduzem o comportamento verificado no geral para micelas com diferentes conteúdos de água. Neste caso foi obtida maior actividade enzimática para a amidase purificada da estirpe AI3.

A determinação da razão entre a actividade específica dos enzimas na forma de células intactas, extracto celular e purificados L10 e AI3 no sistema de micelas invertidas para cada valor de w_0 e a actividade específica em solução aquosa permite avaliar a aquisição de maior actividade do enzima no sistema de micelas invertidas face ao meio convencional aquoso. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3 e sugerem que a amidase AI3 face à amidase de L10 sofre um aumento maior da sua actividade enzimática de síntese de ácido acetohidroxâmico em micelas, o que demonstra que o conteúdo em água parece favorecer mais a reacção de síntese do hidroxamato quando esta reacção é catalisada pelo enzima AI3 que pelo amidase L10, denotando que o primeiro tem maior sensibilidade ao conteúdo de água da misturas reaccional.



Actividade específica em micelas invertidas/ Actividade específica em meio convencional aquoso						
w_0	L10			A13		
	Células intactas	Extracto celular	Amidase purificada	Células intactas	Extracto celular	Amidase purificada
3,5	0,818	0,667	1,787	3,000	1,556	1,20
4	0,939	1,422	1,671	2,846	1,481	2,40
5	2,182	1,556	1,902	4,846	2,630	2,00
6	3,061	2,356	3,400	8,462	3,556	7,20
7	4,545	3,800	3,400	9,154	5,037	-
8	6,182	4,756	3,746	8,538	4,852	-
9	7,182	5,267	5,475	11,154	5,407	-
10	9,333	7,089	5,705	13,923	6,407	7,60
11	7,030	5,111	5,187	11,462	5,370	-
11,5	5,576	4,867	4,092	11,077	4,815	4,80

Tabela 3- Razão dos valores entre a actividade específica no sistema de micelas invertidas de TTAB em heptano:octanol em diferentes conteúdos de água e a actividade específica em meio convencional aquoso de TMEG, para a solução purificada da amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e A13.

A análise de efeito do conteúdo em água nas micelas invertidas no rendimento de síntese do ácido acetohidroxâmico pelas soluções contendo amidase L10 está esquematizada na Figura 11. De facto nem sempre as melhores condições para a actividade enzimática (velocidade inicial da reacção) poderão demonstrar o mais elevado rendimento de síntese pois ao fim de algum tempo de reacção poderão não estar reunidas condições de estabilidade do biocatalisador ou dos substratos de reacção, bem como inibições do biocatalisador pelo produto, o que pode influenciar os resultados. Como pode ser observado na Figura 11, o estudo do rendimento da reacção de síntese de acetohidroxamato em micelas invertidas revelou uma tendência em forma de sino com melhores condições para a obtenção de um elevado rendimento para w_0 de 10, excepto para a amidase L10 onde ocorre a w_0 de 11. No entanto, as células intactas e extracto celular livre apresentam maior rendimento de síntese em comparação com a solução de amidase L10 purificada, em alguns casos próximo de 100 %, possivelmente devido ao efeito protector dos constituintes celulares presentes nas células intactas e no extracto celular livre de células na prevenção da inactivação do biocatalisador.



O mesmo tipo de análise se poderá fazer para a amidase AI3, no entanto neste caso como pode ser observado na Figura 12, foram obtidos menores rendimentos de síntese comparativamente à estirpe L10 (Figura 11), este facto era esperado face à conhecida termoestabilidade da amidase L10¹⁴. Nesta Figura 12 ficou ainda evidente que a tendência em sino do efeito da água sobre o rendimento de síntese não é tão pronunciada quanto para a estirpe L10 (Figura 11) principalmente na solução purificada da amidase AI3, onde independentemente do conteúdo em água se atinge o mesmo rendimento de reacção. Do mesmo modo que para a L10 (Figura 11), as células intactas e extracto celular da *Pseudomonas aeruginosa* AI3 (Figura 12) demonstram sempre maior rendimento de síntese de acetohidroxamato face ao enzima AI3 purificado, no entanto os rendimentos para este biocatalisador são inferiores a 70 %.

As considerações anteriores poderão ser explicadas pelas diferenças de especificidade e afinidade para substratos diferentes mas especialmente pelas diferenças de termoestabilidade conhecidas entre a amidase L10 e a amidase AI3¹⁴. A termoestabilidade de um enzima é uma função das forças estabilizadoras do enzima como ligações de hidrogénio, interacções hidrofóbicas, ligações iónicas e pontes dissulfito.⁸³ Neste caso, a amidase L10 sendo termoestável demonstrará maior sensibilidade que a AI3, quando fora do ambiente celular protector, a pequenas variações do conteúdo em água. Variações do conteúdo de água poderão interferir nas ligações e interacções estabilizadoras da estrutura do enzima da estirpe L10 alterando o seu comportamento catalítico. Em oposição, a amidase de AI3 demonstra rendimentos semelhantes de células intactas, extracto celular e enzima purificada (Figura 12) não exibindo uma curva em sino tão acentuada tal como ficou evidente anteriormente para a variação da actividade de síntese em micelas na Figura 10.

Estas diferenças serão mais adiante elucidadas por um estudo por espectroscopia de FTIR dos diferentes enzimas para as diferentes condições de reacção estudadas, nomeadamente o efeito do conteúdo em água nas micelas em alterações conformacionais ou nas interacções do solvente com os diferentes componentes da estrutura secundária dos enzimas L10 e AI3.

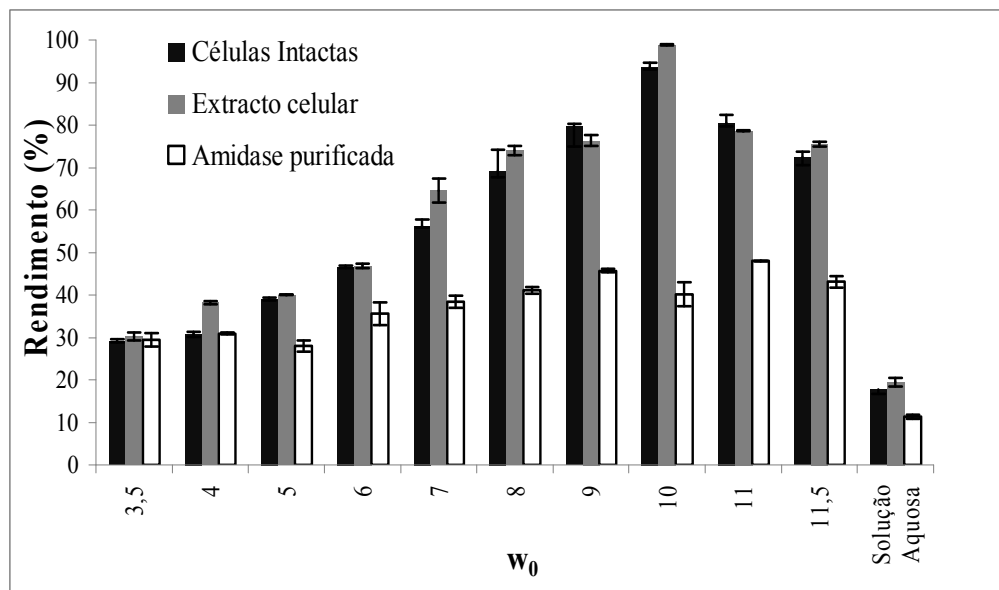


Figura 11- Comparação do rendimento de síntese de ácido acetohidroxâmico em solução aquosa de tampão TMEG com o rendimento de síntese em micelas invertidas em diferentes conteúdos de água para células de *Pseudomonas aeruginosa* L10 (preto), extracto celular livre de células (cinza) e solução de amidase L10 purificada (branco). As condições da reacção estão descritas nos Materiais e Métodos.

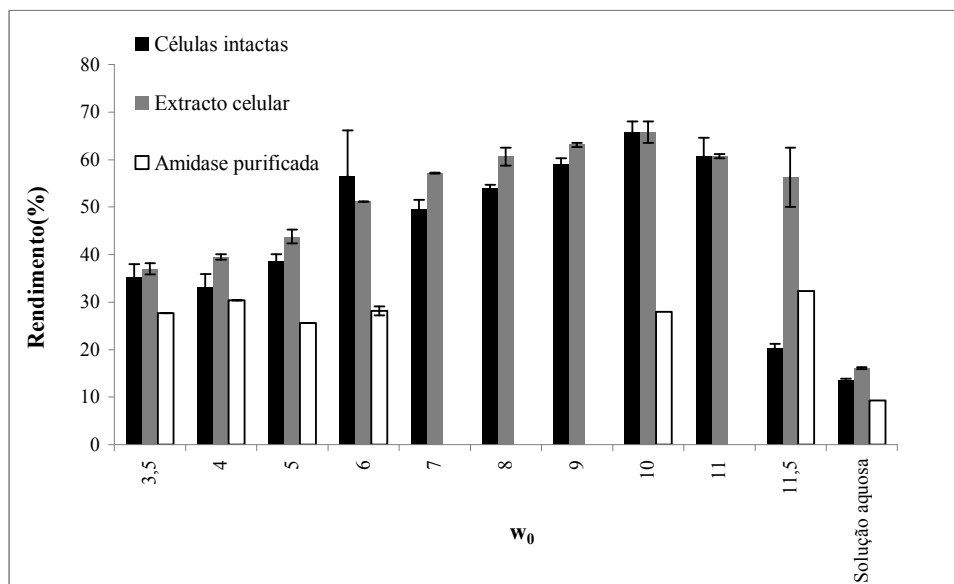


Figura 12- Comparação do rendimento de síntese de ácido acetohidroxâmico em solução aquosa de tampão TMEG com o rendimento de síntese em micelas invertidas em diferentes conteúdos de água para células de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 (preto), extracto celular livre de células (cinza) e solução de amidase AI3 purificada (branco). As condições da reacção estão descritas nos Materiais e Métodos.



3.3 Estabilidade em micelas invertidas e em meio convencional aquoso

Face às considerações anteriores, foi estudado o efeito do encapsulamento em micelas invertidas na estabilidade da amidase L10 e AI3, usando células intactas, extracto celular e solução de enzima purificada.

Os resultados da actividade enzimática residual ao longo de vários dias de armazenamento do biocatalisador encapsulado em micelas a 24 °C, estão esquematizados nas Figuras 13 e 14 para a amidase L10 e amidase AI3, respectivamente, e permitem calcular a constante de inactivação e o $t_{1/2}$ do biocatalisador quando encapsulado no sistema de micelas invertidas, Tabela 4.

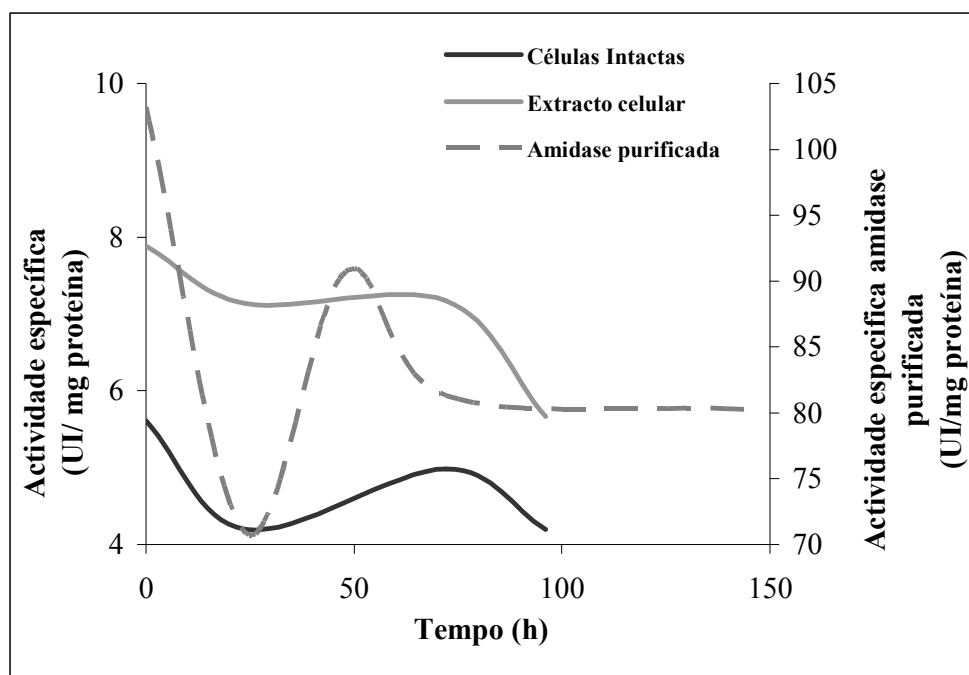


Figura 13- Efeito na actividade enzimática de síntese de acetohidroxamato do encapsulamento em sistema de micelas invertidas ($w_0=10$) de TTAB de células intactas, extracto celular e solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* L10.

Como se pode observar pela Figura 13 e 14, as células intactas, o extracto celular livre de células e a solução de amidase purificada para ambas as estirpes apresentam o mesmo tipo de decaimento de actividade enzimática residual ao longo do tempo.

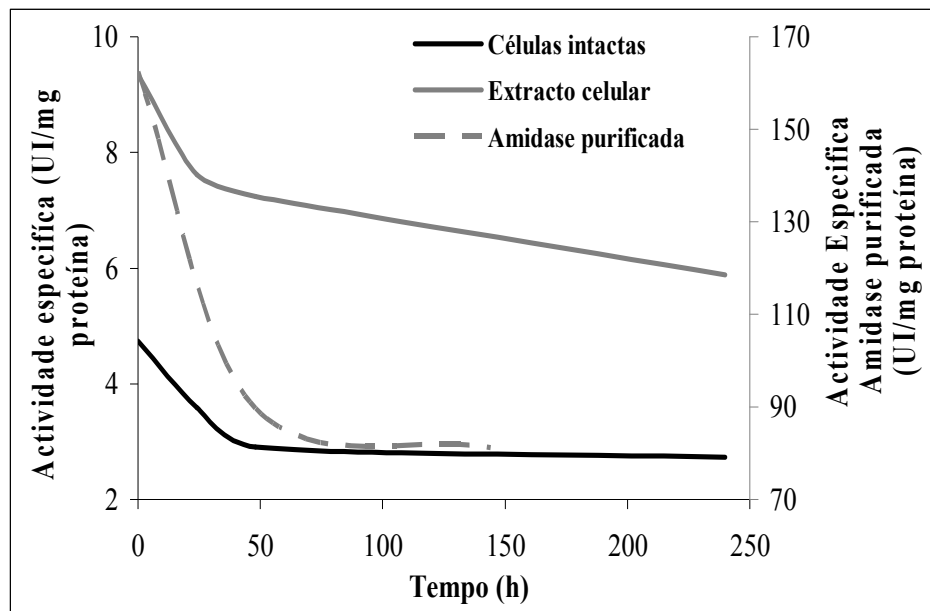


Figura 14- Efeito na actividade enzimática de síntese de acetohidroxamato do encapsulamento em sistema de micelas invertidas ($w_0=10$) de TTAB de células intactas, extracto celular e solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* AI3.

	Micelas invertidas	Constante de inactivação (h^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)
<i>P.aeruginosa</i> L10	Células intactas	0,0027	9
	Extracto celular	0,0034	8,5
	Amidase Purificada	0,0017	17
<i>P.aeruginosa</i> AI3	Células intactas	0,0017	17
	Extracto celular	0,0011	26
	Amidase purificada	0,0048	6

Tabela 4- Constante de inactivação e tempo de meia vida de soluções contendo amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3 encapsuladas em micelas invertidas ($w_0=10$) de TTAB

Os valores obtidos para o $t_{1/2}$ da amidase da estirpe mutante L10 indicam que, apesar de no geral a L10 apresentar uma maior actividade e rendimento de síntese de ácido acetohidroxâmico, quando se trata de células intactas e extracto celular livre de células,



apresenta menor estabilidade de armazenamento ($t_{1/2}$ de 9 e 8,5 dias) que células intactas ou extracto celular da estirpe mutante AI3 ($t_{1/2}$ de 17 e 26 dias). Aparentemente a estirpe mutante AI3 apresenta uma maior durabilidade pois é mais estável durante o período de armazenamento desde que o biocatalisador seja mantido dentro do ambiente protector da célula ou do conteúdo celular. Neste caso a parede celular e o conteúdo celular poderão proteger o enzima do efeito de inactivação exercido pelo tensioactivo ou pelo solvente orgânico o que resulta num $t_{1/2}$ de 6 dias para a solução de amidase AI3 purificada. No entanto, tal não acontece para a solução purificada de L10 que demonstra um $t_{1/2}$ de 17 dias. A amidase purificada da estirpe L10 é termoestável, o que não acontece com o enzima da estirpe mutante AI3¹⁴, o que pode justificar a maior estabilidade de armazenamento da amidase purificada L10 demonstrada neste trabalho face à amidase AI3. Quanto à baixa estabilidade do enzima da estirpe L10 quando na forma de células e de extracto ($t_{1/2}$ de 9 e 8,5 dias), poderá resultar de uma inactivação por outros compostos que façam parte do conteúdo celular.

O mesmo estudo foi efectuado usando a enzima em meio convencional aquoso. Os resultados da actividade enzimática residual ao longo de vários dias de armazenamento do biocatalisador em tampão TMEG a 24°C estão esquematizados nas Figuras 15 e 16 para a amidase L10 e amidase AI3, respectivamente. A Tabela 5 mostra os valores de constante de inactivação e o $t_{1/2}$ do biocatalisador quando armazenado em solução aquosa.

Com base na análise dos resultados obtidos verifica-se que, no geral o biocatalisador apresenta maior estabilidade quando armazenado em micelas invertidas que em solução aquosa, excepto para as células intactas de *Pseudomonas aeruginosa* L10. No ambiente aquoso um aumento das interacções entre as moléculas de água e as moléculas do biocatalisador são habitualmente responsáveis pela perda de estabilidade. No entanto, quando o biocatalisador reside nas células intactas existe uma protecção aos efeitos da água tanto para as células de *Pseudomonas aeruginosa* L10 ($t_{1/2}$ de 14,4) como nas AI3 ($t_{1/2}$ de 7,2). Quanto às soluções purificadas da amidase L10, o armazenamento numa solução aquosa levará a uma menor estabilidade ($t_{1/2}$ de 4,6) que no armazenamento em micelas invertidas ($t_{1/2}$ de 17 dias), no entanto o mesmo não acontece para a solução purificada de AI3 que apresenta um $t_{1/2}$ semelhante em ambas as situações de 6 e 7 dias respectivamente.



As considerações anteriores poderão ser relacionadas com as diferenças, já referidas, de termoestabilidade conhecidas entre a amidase L10 e a amidase AI3¹⁴. A amidase L10 sendo termoestável demonstrará maior sensibilidade à presença da água no ambiente o que se reflectirá numa diminuição considerável da sua estabilidade de armazenamento.

De modo a compreender quais as alterações estruturais na amidase que pudessem ser responsáveis pelo comportamento descrito anteriormente pela amidase da estirpe L10 e AI3, estudou-se a influência do encapsulamento dos diferentes enzimas em micelas invertidas na sua estrutura secundária recorrendo a espectroscopia de infravermelho de FTIR.

	Meio convencional aquoso	Constante de inactivação (h ⁻¹)	Tempo de meia vida (dias)
<i>P.aeruginosa</i> L10	Células intactas	0,002	14,4
	Extracto celular	0,0076	3,8
	Amidase purificada	0,0063	4,6
<i>P.aeruginosa</i> AI3	Células intactas	0,004	7,2
	Extracto celular	0,01	3
	Amidase purificada	0,0041	7

Tabela 5- Constante de inactivação e tempo de meia vida de soluções contendo amidase de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3 em tampão TMEG.

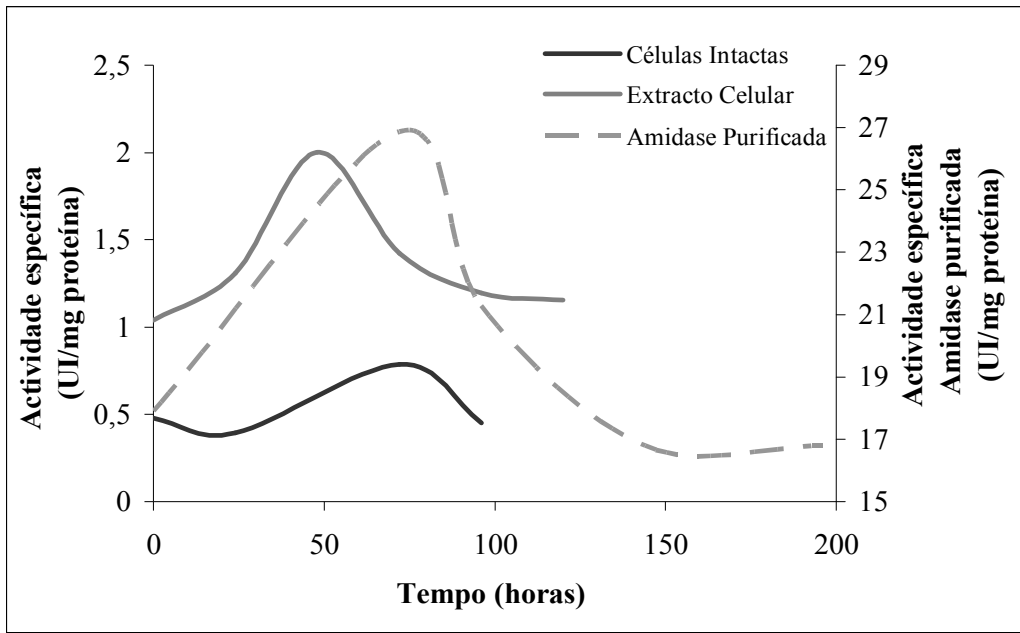


Figura 14- Efeito na actividade enzimática de síntese de acetohidroxamato do armazenamento de células intactas, extracto celular e solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* L10 em tampão TMEG.

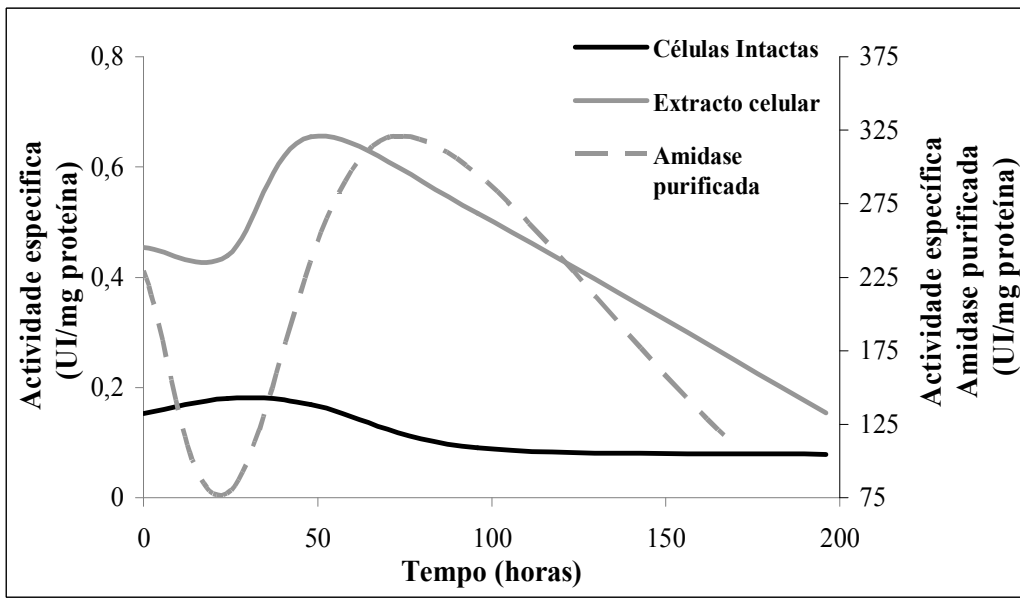


Figura 15 - Efeito na actividade enzimática de síntese de acetohidroxamato do armazenamento de células intactas, extracto celular e solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* A13 em tampão TMEG.



3.4 Estudo da estrutura da amidase em diferentes meios

A espectroscopia FTIR é uma ferramenta que permite a análise da estrutura de proteínas em diferentes meios a partir da análise das bandas amida que são devidas à vibração do esqueleto peptídico da proteína ⁷⁵.

As frequências de maior interesse na análise estrutural das proteínas são a amida I e amida II. As bandas de absorção da amida I são devidas à vibração de alongamento do grupo carbonilo, enquanto a banda da amida II está associada à curvatura N-H e C-N. A região da amida I é utilizada com frequência para determinar a estrutura secundária da proteína. A amida II apesar de ser sensível à estrutura secundária não é tão utilizada como a amida I ^{75, 84}.

Alterações nas bandas amidas num espectro de infravermelho são geralmente devidas a modificações na estrutura secundária das proteínas. No entanto, pequenas alterações na frequência vibracional das amidas, podem ser devidas a modificações das ligações de hidrogénio envolvidas nas ligações peptídicas ⁷⁵. As ligações de hidrogénio estabilizam a estrutura das proteínas sendo essenciais para a catálise e para a estabilidade enzimática ⁸⁴. A espectroscopia vibracional é um dos poucos métodos que permite a avaliação directa da força dessas ligações. Assim, à medida que a frequência diminui, aumentam a força das ligações de hidrogénio e vice-versa ^{75, 85}.

Deste modo foi avaliado por espectroscopia de FTIR o efeito do encapsulamento da amidase das duas estirpes em micelas invertidas para diferentes conteúdos de água. O software OPUS^{NT} foi utilizado para a aquisição e edição dos espectros de FTIR das diferentes soluções de micelas invertidas contendo enzima e deste em solução aquosa.

A Figura 16 representa o espectro de FTIR obtido para a solução de micelas invertidas com w_0 de 10 contendo amidase purificada da estirpe mutante L10 incluindo a região da amida I entre 1600 e 1700 cm^{-1} , o modo vibracional mais utilizado na análise da estrutura secundária de proteínas ⁷⁵.

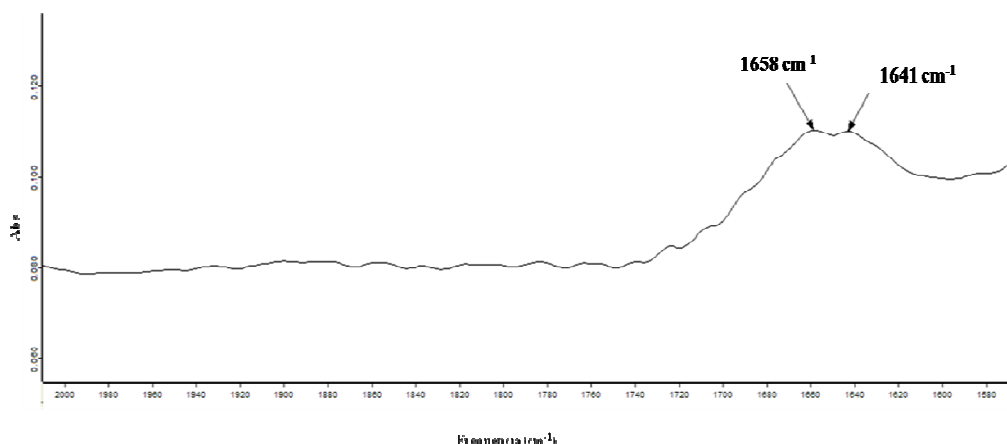


Figura 16- Espectro de absorção por FTIR mostrando a região da amida I da solução de micelas invertidas de 200 mM de TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) com $w_0=10$ contendo amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* L10.

Pela observação da Figura 16 é visível uma linha de base direita na região entre 2000-1800 cm^{-1} que se obteve após subtração digital do solvente utilizando o software OPUS^{NT} e dois picos evidentes associados à banda da amida I. De modo similar usou-se como critério para uma subtração rigorosa a eliminação da banda a 1209 cm^{-1} . As características espectrais observadas na região da amida I poderão ser atribuídas a absorções de estruturas secundárias nomeadamente em hélice- α aproximadamente a 1658 cm^{-1} e folhas- β a 1641 cm^{-1} ⁷⁵.

Um conceito generalizado é que a banda da amida I de uma proteína consiste em muitas bandas sobrepostas que representam diferentes elementos de estrutura secundária da proteína tal como hélices- α , folhas- β , voltas e outras. A largura das bandas componentes da amida I no espectro experimental é maior que a separação entre os picos adjacentes ⁷⁵. Uma análise mais detalhada do espectro poderá ser efectuada pelo cálculo da segunda derivada do espectro de absorção ⁷⁵, o que permitiu aumentar a resolução aumentando a separação entre as bandas componentes da amida I. Na segunda derivada os picos positivos do espectro original de absorção tornam-se bandas negativas na mesma região do espectro da segunda derivada. A segunda derivada dos espectros foi efectuada recorrendo ao software OPUS^{NT} e encontra-se representada na Figura 17.

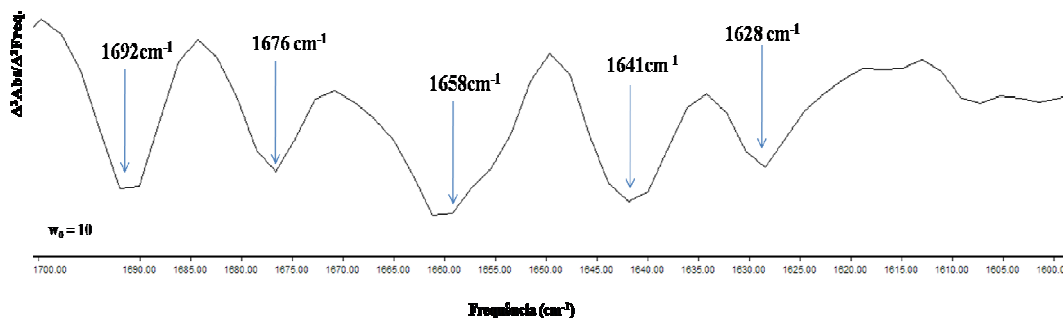


Figura 17-Segunda derivada do espectro de absorção por FTIR na região da amida I da solução de micelas invertidas de 200 mM de TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) com $w_0=10$ contendo amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* L10.

A análise da segunda derivada do espectro de FTIR na região da amida I (Figura 17) revelou a presença de uma banda predominante a 1658 cm^{-1} e duas bandas na região a 1641 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} . Estudos experimentais de proteínas de estrutura conhecida demonstram que as absorções no espectro do infravermelho na gama entre $1650\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ poderão ser atribuídas a conformações em hélices- α ⁷⁵. Cálculos teóricos e estudos experimentais em proteínas e péptidos permitem atribuir a estrutura em folhas- β para as bandas de absorção na região entre $1620\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ ⁸⁶⁻⁹². A Figura 18 permite observar a segunda derivada do espectro de FTIR na região da amida I para a amidase purificada da estirpe L10 em solução aquosa. Um dos problemas que limitam a aplicação da espectroscopia de IR à análise conformacional de proteínas tem a ver com a absorção da água nas regiões de interesse no espectro⁹⁴, no entanto este problema foi diminuído pela utilização de $^2\text{H}_2\text{O}$ como solvente e de um pequeno percurso óptico.

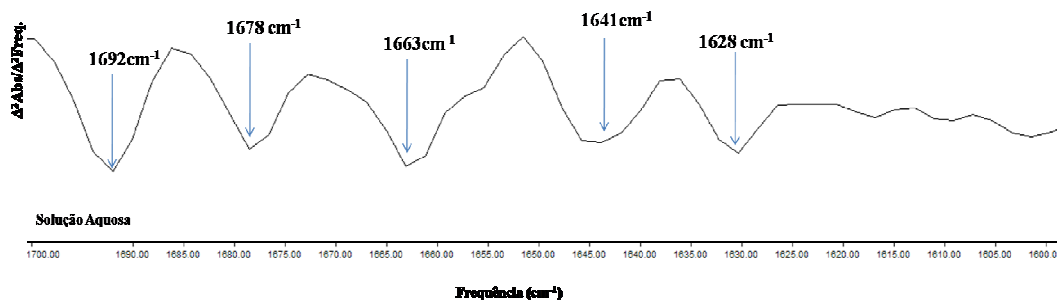


Figura 18-Segunda derivada do espectro de absorção por FTIR na região da amida I da solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* L10 em $^2\text{H}_2\text{O}$



A observação da Figura 17 e 18 permitem afirmar que no encapsulamento da amidase L10 em micelas invertidas de TTAB com w_0 de 10 não ocorreram alterações conformacionais globais pois a segunda derivada de ambos os espectros de IR não demonstra aparentemente alterações substanciais na região da amida I. No entanto foram detectadas pequenas alterações nas posições dos picos para mais baixas frequências o que é indicativo de um aumento da força das ligações de hidrogénio no encapsulamento⁹⁴. É de notar que no caso da amidase L10 em solução aquosa o pico de 1663 cm^{-1} (Figura 18) habitualmente atribuído a hélices- α , no enzima encapsulado sofre um desvio para 1658 cm^{-1} (Figura 17). Este desvio pode ser indicativo de hélices mais expostas ao solvente estabelecendo mais ligações de hidrogénio nas micelas que em solução aquosa o que favorecerá a actividade de síntese de acetohidroxamato.

Para além disso, quanto à amidase L10 em solução aquosa observam-se picos nas frequências de 1641 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} (Figura 18) atribuídos a folhas- β paralelas e antiparalelas, respectivamente, as últimas possivelmente intermoleculares. Estas mesmas bandas foram observados no espectro correspondente ao enzima encapsulado (Figura 17), no entanto, na Figura 18 observa-se que a banda correspondente às folhas- β paralelas a 1641 cm^{-1} é bastante mais larga aparentando sofrer um desvio para a frequência de 1645 cm^{-1} . A ocorrência de variações na força das ligações de hidrogénio e no acoplamento transitório de dipolos podem influenciar a posição desta banda⁹⁴. Neste caso, quando a amidase L10 é encapsulada ocorrerá um aumento da força das ligações de hidrogénio nas folhas- β paralelas o que se traduz no posicionamento da banda para uma frequência de 1641 cm^{-1} (Figura 17) o que favorecerá a reacção de síntese do acetohidroxamato.

Na observação da segunda derivada dos espectros da amidase L10 encapsulada em micelas invertidas para os vários w_0 na região da amida I foi notória a existência de dois tipos de espectros representados na Figura 19. No caso da amidase L10 encapsulada em micelas de conteúdos de água com w_0 de 3,5 e 4 e para o enzima encapsulado em micelas com conteúdos de água superiores a w_0 de 5 inclusive, a segunda derivada dos espectros encontra-se representada na Figura 19 no topo e em baixo respectivamente.

No geral, a segunda derivada dos espectros da amidase L10 em micelas com conteúdos de água iguais ou superior a w_0 5 não apresentam diferenças substanciais na região da amida I, como se pode constatar por comparação do espectro apresentado em baixo na



Figura 19 com a Figura 17, que representa w_0 de 10. Para estes conteúdos de água a variação do conteúdo de água na micela não parece ter afectado a estrutura ou as interacções na estrutura do enzima.

No entanto, os resultados mostram que, para baixos conteúdos de água nas micelas, a segunda derivada do espectro de FTIR da amidase L10 apresenta uma banda na região a 1649 cm^{-1} e a 1636 cm^{-1} que poderá ser atribuída a hélices- α e folhas- β intermoleculares⁹⁴. A formação de ligações de hidrogénio fortes intermoleculares tem sido sugerida como responsável pelo aparecimento de bandas na região de 1680 cm^{-1} na região de 1625 cm^{-1} em proteínas desnaturadas⁹⁴, o que se verifica neste caso para 1684 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} . Este facto sugere que, dado o baixo conteúdo de água micelar e a pequena dimensão da micela, ocorreu uma desorganização da estrutura secundária das folhas- β , neste caso um rearranjo por formação de interacções intermoleculares responsável por um baixo rendimento e baixa actividade de síntese demonstrada pelo enzima para micelas de w_0 3,5 e 4 (Figura 9).

A comparação da segunda derivada do espectro de FTIR da amidase L10 em solução aquosa na região da amida I com a segunda derivada do enzima encapsulado em micelas de w_0 3,5 e 4 mostra que a banda correspondente às hélices- α posicionada a 1663 cm^{-1} (Figura 18) foi desviada para 1649 cm^{-1} (Figura 19) na amidase encapsulada com baixo conteúdo em água. Este desvio poderá ser associado ao aumento da força das ligações de hidrogénio nas hélices- α do enzima confinado ao microambiente micelar. Este desvio foi também verificado para o enzima encapsulado em micelas de maior conteúdo de água, superior a w_0 5, no entanto neste caso a banda atribuída às hélices- α surgiu a uma frequência de 1658 cm^{-1} (Figura 17). Estes resultados poderão evidenciar que as hélices- α poderão, devido a estarem mais expostas ao solvente, como sugere a estrutura tridimensional da amidase L10, aumentar a força das ligações de hidrogénio estabelecidas com a água no ambiente micelar mais confinado, o que é verificado pelo desvio da banda a 1663 cm^{-1} do enzima em solução aquosa (Figura 18), para menor frequência, 1658 e 1649 cm^{-1} respectivamente para w_0 superior a 5 e inferior a 4 (Figura 19). No entanto, ao contrário do que seria de esperar, o aumento do conteúdo de água na micelas, para w_0 superiores a 5, não implica maior desvio da banda para menor frequência. A menor frequência associada à banda atribuída às hélices- α foi obtida para o enzima encapsulado com w_0 inferiores a 4 o que sugere que, em micelas de pequena



dimensão ocorreu maior aumento da força das ligações de hidrogénio associadas a hélices- α . O estabelecimento de ligações de hidrogénio intramoleculares fortes nas hélices- α e a formação de interações intermoleculares nas folhas- β foram responsável, possivelmente por diminuição da plasticidade conformacional necessária para a catálise enzimática, pela obtenção de baixos rendimentos e baixas actividades de síntese de acetohidroxamato (Figura 9). Estas alterações na estrutura secundária do enzima quando encapsulado poderão ser atribuídas ao pequeno raio das micelas a estes w_0 o que não favorecerá a reacção de síntese, independentemente do baixo conteúdo em água.

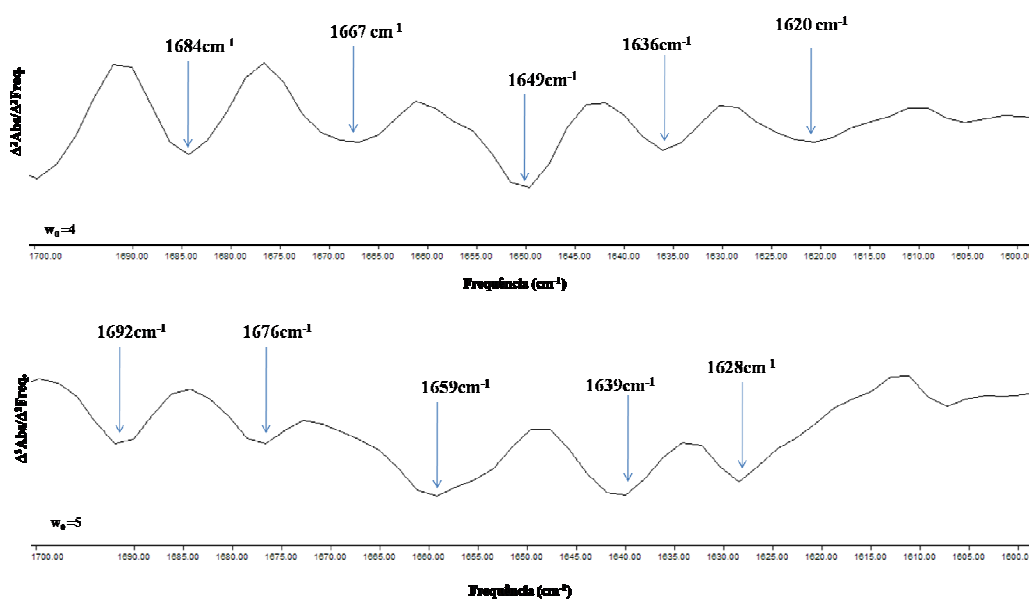


Figura 19- Comparação na região da amida I da segunda derivada dos espectros de FTIR da solução de micelas invertidas de 200 mM TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) contendo amidase da *Pseudomonas aeruginosa* L10 para w_0 de 4 (cima) e 5 (em baixo).

Idealmente a amidase L10 encapsulada em micelas invertidas apresenta maior rendimento e actividade de síntese para um w_0 de 10. No entanto, a segunda derivada dos espectros para conteúdos de água nas micelas para w_0 iguais ou superiores a 5 não demonstram aparentemente alterações entre si que possam evidenciar alterações na estrutura secundária do enzima que expliquem o seu sucesso em micelas de w_0 10. O cálculo da razão entre a intensidade da banda atribuída às hélices- α e a intensidade da banda atribuída às folhas- β poderá clarificar alterações estruturais que ocorrem na estrutura secundária da amidase L10 encapsulada e em solução aquosa e encontra-se representado na Figura 20.



Como se pode observar na Figura 20 os valores das razões para w_0 iguais ou superiores a 5 são bastante aproximados, oscilando entre 1 e 1,2, sugerindo que quando nestas micelas a amidase L10 exibirá na sua estrutura secundária igual contribuição de ambos os componentes hélices- α e folhas- β , sugerindo que nestas micelas a variação no conteúdo de água não interferirá grandemente na estrutura do enzima. No entanto, o enzima demonstrou maior rendimento e actividade de síntese para w_0 de 10. Em solução aquosa a razão será da ordem de 2, o que sugere uma maior contribuição de hélices- α , o mesmo ocorrerá em micelas com conteúdos de água inferiores, $w_0=3,5$ e 4, mas aparentemente esta situação não favorece a catálise e atingiram-se rendimentos e actividades de síntese semelhantes em solução aquosa e para micelas a estes w_0 (Figura 9 e 12). A disponibilidade da água para micelas maiores e em solução aquosa parece comprometer o rendimento e actividade de síntese do acetohidroxamato o que se traduz em mais fracos resultados para w_0 de 11 e 11,5 e para o enzima quando em solução aquosa. No caso de conteúdos de água micelar menores, o que se traduz em micelas de menores dimensões⁶⁸, possivelmente a dimensão da micela compromete a liberdade conformacional necessária à catalise.

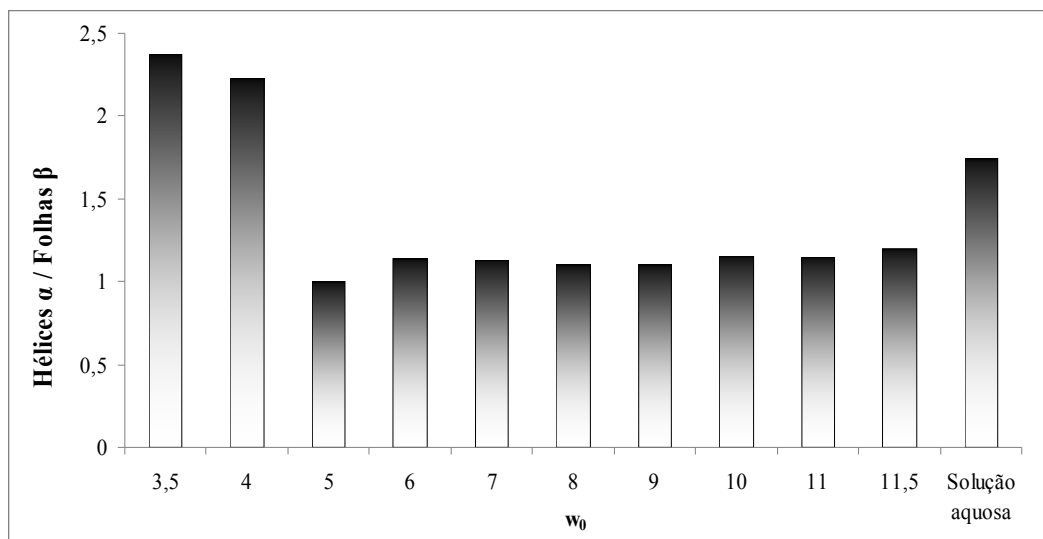


Figura 20 - Razão dos valores de absorvância entre a banda atribuída a hélices- α e a banda atribuída a folhas- β da segunda derivada dos espectros de FTIR da amidase L10 em $^2\text{H}_2\text{O}$ (solução aquosa) e da amidase L10 em micelas invertidas de 200 mM de TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) para diferentes w_0 . Para a determinação desta razão de valores foram escolhidas as bandas 1649 e 1636 cm^{-1} para $w_0=3,5$ e 4; 1659 e 1641 cm^{-1} para w_0 maior que 5 inclusive e 1663 e 1645 cm^{-1} para a solução aquosa.



A Figura 21, em cima, representa a segunda derivada do espectro de FTIR obtido para a solução de micelas invertidas com w_0 de 11,5 contendo amidase purificada da estirpe AI3 na região da amida I entre 1600 e 1700 cm^{-1} , em baixo, encontra-se a segunda derivada do espectro de FTIR da amidase AI3 no meio convencional aquoso, na mesma região. A segunda derivada destes espectros foi efectuada recorrendo ao software OPUS^{NT}.

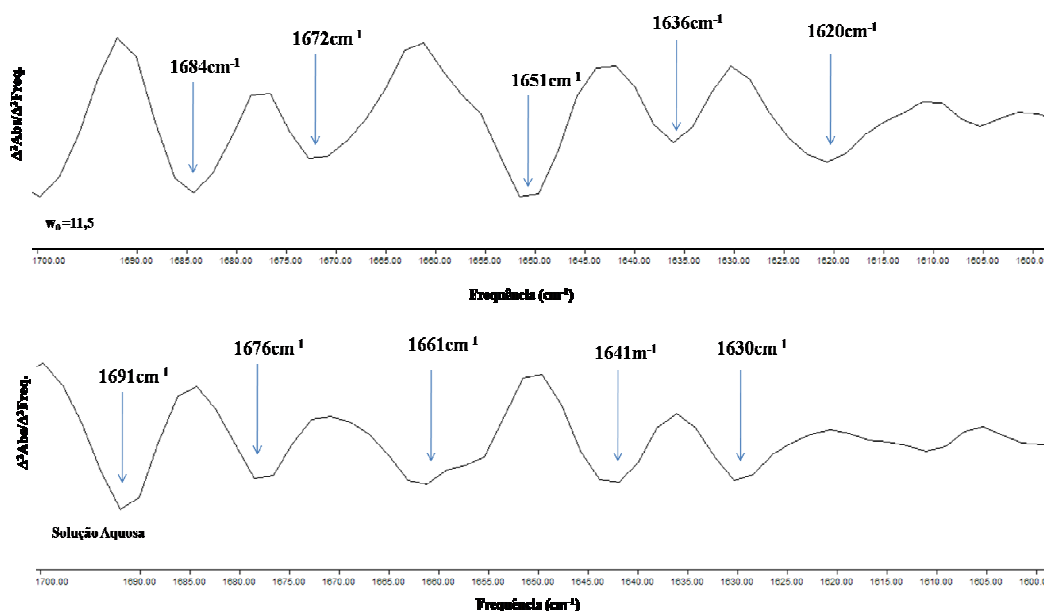


Figura 21- Comparação na região da amida I da segunda derivada dos espectros de FTIR da solução de micelas invertidas de 200 mM TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) contendo amidase da *Pseudomonas aeruginosa* AI3 para w_0 de 11,5 (cima) e da solução de amidase purificada de *Pseudomonas aeruginosa* AI3 em $^2\text{H}_2\text{O}$ (em baixo).

A análise da segunda derivada do espectro de FTIR na região da amida I da amidase AI3 em solução aquosa revelou a presença de uma banda predominante a 1661 cm^{-1} e duas bandas na região a 1641 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} (Figura 21 (em baixo)). Como referido absorções no espectro do infravermelho nestas gamas poderão ser atribuídas para o primeiro pico a conformações em hélices- α ⁷⁵ enquanto que as últimas se podem atribuir a estrutura em folhas- β antiparalela e paralela respectivamente^{94,95}.

Quanto à segunda derivada do espectro de FTIR do enzima encapsulado na região da amida I (Figura 21 (cima)) apresenta apenas duas bandas, uma a 1651 cm^{-1} e outra a 1636 cm^{-1} atribuídas frequentemente a hélices- α e folhas- β com interacções intermoleculares⁹⁴. Este comportamento foi verificado para a segunda derivada dos espectros de FTIR da amidase AI3 encapsulada para diferentes conteúdos de água,



como pode ser verificado no Capítulo VI em e talvez justifique considerações anteriores sobre a actividade e rendimento de síntese deste enzima não variar drasticamente para micelas de diferentes conteúdos em água o que se traduz num perfil em forma de sino pouco pronunciado (Figura 10 e 12). A estrutura secundária da amidase AI3 não varia drasticamente para micelas de diferentes conteúdos de água o que se traduz em rendimentos e actividades de síntese de acetohidroxamato próximos para diferentes w_0 . Em oposição a estrutura secundária do enzima em solução aquosa é consideravelmente diferente que a estrutura do enzima encapsulado o que se traduz numa grande variação de comportamento catalítico exibido em diferentes meios (Tabela 3). Por observação da segunda derivada dos espectros de FTIR do enzima encapsulado é visível a formação de folhas- β com associações intermoleculares pelo aparecimento de dois picos característicos na região de 1684 cm^{-1} e a 1620 cm^{-1} , o que não acontece em solução aquosa. O desvio do pico atribuído a hélices- α que surge para uma frequência de 1661 cm^{-1} no espectro da segunda derivada da amidase AI3 em solução aquosa sofre um desvio no encapsulamento para uma frequência menor de 1651 cm^{-1} o que é indicativa de um aumento da força das ligações de hidrogénio no encapsulamento. De facto e, no caso das hélices- α a região de absorção é habitualmente de $1650\text{-}1655\text{ cm}^{-1}$ para a maioria das proteínas solúveis, no entanto em hélices- α mais expostas ao solvente ($^2\text{H}_2\text{O}$) pode haver desvio para uma região de maior frequência o que sucede notoriamente para a amidase quando em solução aquosa a 1661 cm^{-1} ⁷⁵. Esta exposição ao solvente levará ao aumento da força das ligações de hidrogénio com o solvente num ambiente mais confinado como o microambiente micelar o que se traduz num desvio deste pico para menores frequências.

De modo a clarificar as alterações estruturais da amidase AI3 que induziram a um comportamento catalítico diferenciado para micelas com diferentes conteúdos de água e que se traduziram em maior actividade de síntese e maior rendimento em micelas de w_0 10 foi efectuado as razões dos picos na região da amida I. Os resultados estão representados na Figura 22.

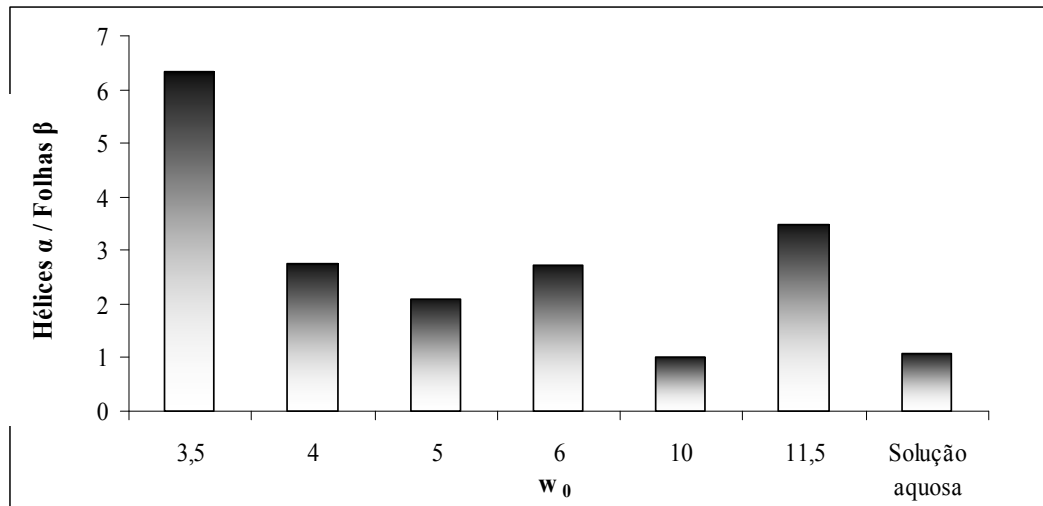


Figura 22-Razão dos valores de absorvância entre a banda atribuída a hélices- α e a banda atribuída a folhas- β da segunda derivada dos espectros de FTIR da amidase AI3 em TME em $^2\text{H}_2\text{O}$ (solução aquosa) e da amidase AI3 em micelas invertidas de 200 mM de TTAB em heptano-octanol 80/20 (v/v) para diferentes w_0 . Para a determinação desta razão de valores foram escolhidas as bandas 1651 e 1636 cm^{-1} para os sistemas de micelas invertidas com diferentes conteúdos de água e 1661 e 1641 cm^{-1} para a solução aquosa.

Os resultados da Figura 22 demonstram claramente o aumento do conteúdo em hélices- α para as condições que exibem mais baixa actividade e rendimento de síntese em micelas invertidas traduzida pelos elevados valores da razão. Em oposição a maior actividade de síntese e o elevado rendimento observado pelo enzima em micelas de w_0 10 poderá ser explicado pela semelhança estrutural da amidase AI3 quando encapsulada nestas micelas com o enzima em solução aquosa o que se traduz em valores muito semelhantes de razão de intensidade dos picos. No entanto, o enzima encapsulado apresenta folhas- β com um aumento de interações intermoleculares e estabelece ligações de hidrogénio mais fortes com o solvente, como observado anteriormente na (Figura 21 (cima)). Estas interações que ocorrem na amidase AI3 quando na micela favorecem a síntese possivelmente pela indisponibilidade de moléculas de solvente, o que não parece acontecer em solução aquosa onde possivelmente a disponibilidade de água parece favorecer catálise das reacções de hidrólise.

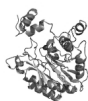
Na literatura ocorrem referências a um vasto número de proteínas cuja estrutura foi analisada por espectroscopia de FTIR quer em meio aquoso quer em meio não aquoso. Como por exemplo diferenças conformacionais entre a forma nativa e a forma reactiva da α_1 -antitripsina⁹⁶ e em metaloproteínas^{97, 98}, onde se analisou alterações conformacionais após a ligação a iões metálicos. Foi também efectuada uma



caracterização estrutural em meio não convencional para um péptido sintético em solvente orgânico ^{89,92}, no entanto parecem não ocorrer referências a catálise em meio não convencional complementadas por análise estrutural por FTIR de enzimas encapsuladas, da forma como ficou demonstrado neste trabalho. Neste sentido este trabalho surge como um importante contributo numa área ainda por explorar.

Capítulo IV

Conclusões
E
Perspectivas
Futuras



4 Conclusões e Perspectivas Futuras

4.1 Conclusões

As amidases de origem microbiana têm um elevado interesse devido às suas aplicações em vários campos, desde a biotecnologia à medicina, mas também devido ao facto de poder ser utilizada em aplicações industriais. Este facto está relacionado com a vasta gama de substratos sobre o qual a amidase pode apresentar especificidade e nas inúmeras reacções que podem ser catalisadas recorrendo à utilização deste biocatalisador. Apesar de existirem vários estudos sobre a amidase, ainda existem algumas características que necessitam de ser investigadas mais profundamente, uma vez que para considerar um tão vasto leque de aplicações é necessário conhecer a fundo a natureza e funcionamento deste enzima. Uma das potencialidades de aplicação está relacionada com a síntese de ácidos hidroxâmicos que é catalisada por estes enzimas.

No presente trabalho foram utilizadas como fontes de amidase, as células intactas das estirpes L10 e AI3 de *Pseudomonas aeruginosa*, o extracto celular livre de células e as amidases L10 e AI3 purificadas destas estirpes. Como tal começou por se desenvolver um esquema de purificação que se revelasse eficiente e rápido de modo a obter soluções de ambas as amidases, soluções aparentemente purificadas e homogéneas de amidase L10 e AI3 para os estudos posteriores.

Tendo em conta que, uma estratégia que favorece as reacções de síntese está relacionada com a diminuição do conteúdo em água no sistema reaccional, efectuaram-se tentativas de encapsular as diversas fontes dos enzimas num sistema não convencional de micelas invertidas. O sistema de micelas invertidas seleccionado foi composto pelo surfactante catiónico TTAB em heptano/octanol 80/20 (v/v). Procedeu-se ao estudo da actividade e rendimento de síntese de acetohidroxamato obtidos para o encapsulamento num sistema de micelas invertidas com diferentes conteúdos de água de células intactas, extracto celular e enzima purificada da estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e AI3. Os resultados obtidos foram comparados com os mesmos parâmetros calculados para a reacção em solução aquosa convencional. Como era esperado, a actividade enzimática da reacção de síntese do ácido acetohidroxâmico revelou-se inferior no meio convencional aquoso em relação ao sistema de micelas invertidas. Demonstrando a



maior actividade de síntese para um conteúdo de água de $w_0 = 10$ para ambas as estirpes e, em especial, para a amidase purificada da *Pseudomonas aeruginosa* AI3 obtendo-se uma actividade específica de 163 UI/ mg de proteína. A amidase AI3 face à amidase de L10 demonstrou, no geral, o maior aumento da sua actividade específica de síntese de ácido acetohidroxâmico em micelas relativamente à solução aquosa.

A determinação do rendimento de síntese do ácido acetohidroxâmico permitiu concluir como esperado a obtenção de maiores rendimentos de síntese para a estirpe L10 face à AI3, dado a termoestabilidade da primeira. Para além disso, os maiores rendimentos de síntese foram obtidos para o sistema de micelas invertidas relativamente à reacção em solução aquosa para ambas as estirpes. No entanto, quer as células intactas quer o extracto celular apresentaram maiores rendimentos na síntese comparativamente ao enzima purificado possivelmente devido ao efeito protector dos constituintes celulares na inactivação do biocatalisador. Rendimentos de cerca de 100 % foram obtidos para o extracto celular da *Pseudomonas aeruginosa* L10 encapsulado em micelas de $w_0 = 10$, o que sugere ser esta a condição ideal para a síntese do ácido acetohidroxâmico em micelas invertidas. Adicionalmente, os processos de purificação são morosos e devido às perdas durante as diferentes etapas pode ocorrer uma diminuição considerável da quantidade de enzima recuperada. Idealmente deveremos obter o enzima de um modo que implique a mínima manipulação mas que permita obter o maior rendimento na produção, o que parece acontecer neste caso.

Foi também feito um estudo da estabilidade de armazenamento do enzima a 24 °C na forma de células intactas, extracto celular e amidase purificada quer no sistema de micelas invertidas quer para a solução aquosa, uma vez que, este parâmetro é de elevada importância quando se fala da utilização de biocatalisadores ao nível da indústria.

Os resultados sugerem que a amidase da estirpe mutante AI3 quando encapsulada em micelas invertidas será mais estável no armazenamento que a amidase L10 desde que o biocatalisador seja mantido dentro de células intactas ou no extracto celular livre de células pois apresentou nestas situações $t_{1/2}$ superiores. No entanto, também a amidase L10 deverá ser preferencialmente armazenado sob a forma de células intactas ou extracto celular onde demonstrou maiores $t_{1/2}$ que o enzima purificado. No caso da durabilidade das soluções purificadas, a amidase da estirpe L10 apresenta maior



estabilidade ao armazenamento que o enzima da estirpe mutante AI3, quando encapsulado num sistema micelar.

De modo a compreender quais as alterações estruturais na amidase purificada que poderiam ser responsáveis pelo comportamento descrito anteriormente, foi estudada a estrutura do enzima de ambas as estirpes em solução aquosa e quando encapsulado, recorrendo a espectroscopia de FTIR.

Tal como esperado para micelas com diferentes conteúdos de água a estrutura secundária da amidase purificada AI3 não varia drasticamente o que se traduz em rendimentos e actividades específicas de síntese de acetohidroxamato semelhantes para micelas de diferentes w_0 . Comparativamente à estrutura da amidase AI3 em solução aquosa quando encapsulado o enzima AI3 apresenta uma estrutura secundaria com maior contribuição de folhas- β com interacções intermoleculares e nas em hélices- α estabelece ligações de hidrogénio mais fortes com o solvente. Esta estrutura, no entanto, parece ser favorável à catálise da reacção uma vez que o enzima AI3 demonstra um aumento de actividade específica e rendimento de síntese relativamente ao comportamento em solução aquosa de aproximadamente 8 e 3 vezes respectivamente para um w_0 de 10.

Quanto à amidase L10 encapsulado em micelas com conteúdos de água iguais ou superior a $w_0 = 5$ não demonstrou alterações substanciais na sua estrutura secundária face ao enzima em solução aquosa aparentemente com semelhante contribuição de hélices- α e folhas- β . O que sugere que o diferente comportamento catalítico demonstrando em solução aquosa face a micelas e mesmo para micelas de diferentes conteúdos estará relacionado com a disponibilidade de água para a reacção, ou seja uma diminuição de água favorecerá a reacção de síntese de ácido acetohidroxâmico. No entanto, para conteúdos de água muito pequenos de $w_0=3,5$ e 4, verificou-se uma alteração significativa da estrutura secundária da amidase L10 e esta situação não favoreceu a reacção de síntese, comprometida possivelmente por constrangimentos da liberdade conformacional, necessária à catálise, impostos pela pequena dimensão das micelas.

De facto parece que a reacção de síntese catalisada por ambas as amidase L10 e AI3 depende muito mais do, conteúdo em água, da dimensão das micelas e dos impedimentos conformacionais que, de alterações ou interacções que surgem na sua



estrutura, como consequência do encapsulamento, pois apesar de alterações e interações sucederem não foram apenas visíveis para as condições em que o enzima demonstrou melhor comportamento catalítico.

Globalmente a melhor condição para a síntese do ácido acetohidroxâmico será, como já referido, a utilização do extracto celular da *Pseudomonas aeruginosa* L10 encapsulado no sistema de micelas de 200 mM de TTAB em heptano/octanol 80/20 (v/v) ao w_0 de 10. Apesar de neste caso se verificar uma actividade específica de síntese inferior a outros sistemas testados foi obtido um rendimento de síntese de cerca de 100 % para além disso como ficou provado este sistema apresenta uma estabilidade ao armazenamento elevada com um $t_{1/2}$ de 26 dias. Em oposição a utilização da amidase na forma purificada da *Pseudomonas aeruginosa* L10 ou A13 que apresentam actividade específica superior não permitiria obter tão elevados rendimentos de síntese e os processos de purificação são bastante morosos e implicam elevadas perdas de biocatalisador ao longo deste processo.

4.2 *Perspectivas Futuras*

No futuro, uma boa estratégia seria aplicar a combinação de diferentes técnicas de análise estrutural de proteínas além da espectroscopia de FTIR. A aplicação de apenas uma técnica não permite a obtenção de informações sobre todos os aspectos estruturais da proteína assim uma conjugação de diferentes técnicas poderia fornecer informações mais detalhadas sobre o estado químico e físico e/ou bioactividade do enzima em diferentes condições de modo a complementar este trabalho.

A cristalografia de Raios-X é uma excelente técnica na determinação da estrutura tridimensional das proteínas, apresenta tal como qualquer técnica desvantagens associadas como a necessidade de cristais de elevada pureza para analisar e por ser uma técnica que permite apenas a obtenção de dados em que a estrutura da proteína é estática o que não é representativo da natureza dinâmica dos sistemas biológicos. A estrutura apresentada pela amidase em solução aquosa, já é conhecida contudo não será a mesma que a proteína apresenta nestes meios não convencionais. Outra das técnicas utilizadas na determinação da estrutura das proteínas pode ser o NMR que apresenta maior flexibilidade do que a técnica referida anteriormente, mas a interpretação dos dados



resultantes e relativos a proteínas de maiores dimensões pode tornar-se algo bastante complexo.

De modo a complementar este trabalho e de modo a relacionar a estrutura do enzima com a dimensão das micelas invertidas seria interessante uma análise por Light Scattering. Esta análise permite fazer a determinação do diâmetro interno das micelas e deste modo poder-se-ia relacionar a dimensão com as alterações estruturais identificadas por FTIR. Este estudo permitiria relacionar linearmente o valor óptimo de w_0 , onde o enzima demonstra melhor comportamento catalítico, com a variação do diâmetro da micela, pois o espaço disponível para o encapsulamento influencia a conformação e o tamanho da proteína no interior da micelas. Para além disso para complementar o estudo da estabilidade do enzima poderia ter-se efectuado uma análise das alterações estruturais por FTIR durante o período de armazenamento para compreender o mecanismo de inactivação dos enzimas.

Até à data a maior parte das reacções de síntese tem sido levada a cabo em solventes orgânicos, mas recentemente houve um crescente interesse numa outra gama de solventes, os líquidos iónicos. Estes solventes encontram-se normalmente no estado líquido, à temperatura ambiente, e são constituídos unicamente por espécies iónicas podendo ser utilizados na indústria química e farmacêutica e em aplicações de risco do ponto de vista ambiental. Assim sendo, uma alternativa será substituir o solvente orgânico por um líquido iónico com o intuito de reduzir os problemas que advêm da utilização de solventes orgânicos nomeadamente os efluentes gerados no processo.

A biocatálise desempenha importante papel junto aos diversos ramos da indústria através da aplicação de enzimas livres ou de células intactas como catalisadores, onde os produtos da reacção apresentam altos níveis de pureza, minimizam a formação de subprodutos, reduzem o consumo energético e apresentam menor impacto ao meio ambiente. A produção e o uso de biocatalisadores são uma área em expansão devido à grande diversidade natural dos catalisadores biológicos, à disponibilidade de técnicas modernas que permitem a obtenção de enzimas mais tolerantes a solventes orgânicos, e de enzimas com actividades elevadas para substratos não-naturais. A utilização de outras amidase alteradas, como por exemplo a Ph1, W138G, W138S, AIU1N e OUCH4, em reacções de síntese não apenas de derivados destes ácidos hidroxâmicos



mas de outros compostos poderão aumentar a exploração e obtenção de uma maior gama de produtos.

Seria também interessante projectar um reactor de membrana, onde poderia ser acoplada uma membrana de ultrafiltração a um reactor contínuo com agitação (CSTR). Este tipo de sistemas utiliza sistemas constituídos por duas fases líquidas nos quais o biocatalisador estará na forma solúvel (micelas invertidas). A utilização da membrana permite a retenção do biocatalisador dentro do reactor, uma vez que não é permeável ao biocatalisador, podendo também apresentar alguma selectividade face a substratos e produtos, permitindo uma recuperação selectiva do produto no permeado. O índice de pureza do produto obtido poderá ser aumentado por uma qualquer técnica de purificação nomeadamente por HPLC preparativa.

Capítulo V

Bibliografía



5 Bibliografia

¹ Palleroni, N.J., (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1, p.142, Noel R.Krieg, J.G.Holt EDS, William & Wilkins, London.

² www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp (consultado em 09/07/2008).

³ Stover ,C. K., Pham, X. Q., Erwin A. L. ,Mizoguchi , S. D., (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959-964.

⁴ Ambler, R.P.,Auffret, A.D., Clarke, P.H.,(1987). The aminoacid sequence of the alifatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Elsevier*, 215(2), 285-290.

⁵ Cousens, D. J.,Clarke, P.H.,Drew, R.,(1987). The Amidase Regulatory Gene (amiR) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 133, 2041-2052.

⁶ Brammar, W.J., Clarke, P.H., (1973).The subunit structure of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Biochem.* ,34, 177-187.

⁷ Brown, J.E., Brown, P.R., Clarke, P.H., (1969). Butyramide-utilizing mutants of *Pseudomonas aeruginosa* 8602 which produce an amidase with altered substrate specificity. *Journal of General Microbiology*, 57, 273-285.

⁸ Brown, J.E., Clarke, P.H., (1970) Mutations in a regulator gene allowing *P. aeruginosa* 8602 to grow on butyramide. *Journal of General Microbiology*, 64,329-342.

⁹ Brammar, W.J., Clarke, P.H.,Skinner, A.J., (1967).Biochemical and genetic Studies with regulator mutants of the *Pseudomonas aeruginosa* 8602 amidase system. *Journal of General Microbiology*, 47, 87-102.



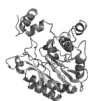
- ¹⁰ Brammar, W.J., Clarke, P.H., (1964). Induction and Repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase. *Journal of General Microbiology*, 37, 307-319.
- ¹¹ Gregoriou, M., Brown, P.R., (1979). Inhibition of aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa* by urea and related compounds. *Eur. J. Biochem.*, 96, 101-108.
- ¹² Domingos, A., Karmali, A., Brown, P.R. (1989). One-step affinity purification of amidases from mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 71, 1179-1184.
- ¹³ Betz, J.L., Clarke, P.H., (1972). Selective evolution of phenyl-acetamide-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 74, 167-177.
- ¹⁴ Brown, J.E., Gregoriou, M., Tata, R., (1978). Relationship between mutant amidase of *Pseudomonas aeruginosa* and hydroxyurea as an inhibitor. *Molecular and General Genetics*, 165, 213-219.
- ¹⁵ Novo, C., Farnaud, S., Tata, R., Clemente, A., Brown, R., (2002). Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochemical Journal*, 365, 731-738.
- ¹⁶ Karmali, A., Pacheco, R., Tata, R., Brown, P. (2001) Substitutions of Thr-103-Ile and Trp-138-Gly in amidase from *Pseudomonas aeruginosa* are responsible for altered kinetic properties and enzyme instability. *Molecular Biotechnology*, 17, 201- 212.
- ¹⁷ Fournand, D. e Arnaud, A. , (2001). Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 381-393.
- ¹⁸ Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A., Galzy, P., (1996). Study of the amidase signature group. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1298, 285-293.



- ¹⁹ Kelly ,M., Clarke P.H. , (1962).An inducible amidase produced by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal of General Microbiology*, 27 305-316.
- ²⁰ Woods, M.J., Findlater, J.D. , Orsi, B.A.,(1979).Kinetics mechanism of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa* . *Biochimica et Biophysica Acta*, 567,225-237.
- ²¹ Andrade, J., Karmali, A.,Carrondo, M.A.,Frazão, C.,(2007). Structure of Amidase from *Pseudomonas aeruginosa* Showing a Trapped Acyl Transfer Reaction Intermediate State. *The Journal of Biological Chemistry* , 27, 19598-19605.
- ²² Brenner, C., (2002). Catalysis in the nitrilase superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 775-782.
- ²³ Farnaud, S., Tata, R., Sohi, M. K., Wan, T., Brown, P. R., and Sutton, B. J.(1999) Evidence that Cysteine - 166 is the active- site nucleophile of *Pseudomonas aeruginosa* amidase : crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme. *Biochemical Journal*, 340, 711–714.
- ²⁴ Pacheco, R., Karmali, A., Serralheiro, M.L.M., Haris, P.I. (2005). Application of Fourier transforms infrared spectroscopy for monitoring hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by a recombinant amidase. *Analytical Biochemistry*, 346, 49-58.
- ²⁵ Nagasawa, T., Yamada, H .,(1989).TIBTECH, 7,153-158.
- ²⁶ Karmali, A., (2000). Trabalho apresentado para apreciação em provas de agregação- Tecnologia de enzimas: programa, conteúdos e métodos de ensino teórico e prático das matérias da disciplina.Universidade de Évora, Évora.
- ²⁷ Cruz, F.M.S., (1995). Tese de Mestrado em Biotecnologia-Purificação e caracterização parcial de uma amidase de uma estirpe mutante de *Pseudomonas aeruginosa* . Instituto Superior Técnico. Lisboa.



- ²⁸ Stadler, RH, Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, PA, Robert, M. C. , Riediker, S. ,(2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* ,419 , 449-450.
- ²⁹ Brown, L., Rhead, M.M.,Bancroft, K.C.C,Allen, N.,(1980). Model studies of the degradation of acrylamide monomer. *Water Res.*, 14 , 775-778.
- ³⁰ Martins, S., Farnaud, S., Pacheco, V., Pacheco, R., Karmali, A., Tata, R. , Brown, P.R., (2000). Differential behaviour of recombinant wild-type and altered amidases on immobilized metal-ion affinity chromatography. *IJBC*, 5,111-129.
- ³¹ Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M. R., Gama, M., (2003) Engenharia Enzimática, Lidel - Edições Técnicas, Lda..
- ³² Taher, A., Sheikh-Taha , M.,Koussa, S., Inati, A., Neeman, R., Mourad, F.,(2001) . Comparison between deferoxamine and deferiprone (L1) in iron-loaded thalassemia patients. *European Journal of Haematology*,67,30-3.
- ³³ Fournand, D., Bigey, F., Ratomahenina,R., Arnaud, A., Galzy P., (1997). Biocatalyst improvement for de production of short-chain hydroxamic acids .*Enzyme and Microb. Technol.*, 20, 424-431.
- ³⁴ Senthilnithy, R., Weerasinghe, S.,Dissanayake, D.P.,(2007).Stability of hydroxamate ions in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*, 851, 109-114 .
- ³⁵ Taybjee, M. H. ,Nadar, S. K. ,MacFadyen, R.J.,(1994). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension. *American Journal of Hypertension*, 17,770-774.



³⁶ Clare, B., Scozzafava A., Supuran, C. ,(2001). Protease Inhibitors Part 13. Specific, Weakly Basic Thrombin Inhibitors Incorporating Sulfonamide Moieties in their Molecule. *J. Enzyme Inhibit.* 16, 1-13.

³⁷ Clements, J.M., Beckett R.P., Brown A., Catlin, G., Lobell, M., Palan ,S., Thomas, W., Whittaker, M., Wood, S., Salama, S., Baker, P.J., Rodgers, H.F., Barynin, V., Rice, D.W., Hunter, M.G., (2001). *Antimicrob Agents Chemother*, 45(2),563-570.

³⁸ Soybir, G., Koksoy, F., Ekiz, F., Yalcin, O., Fincan, K. ,Haklar, G.,Yuksel, M., (1999). The Effects of Free Oxygen Radical Scavenger and Platelet-Activating Factor Antagonist Agents in Experimental Acute Pancreatitis. *Pancreas*, 19(2),143-149.

³⁹ Komatsu ,T., Yamazaki, H., Shimada ,N., Nagayama, S., Kawaguchi, Y., Nakajima, M., Yokoi ,T.,(2001). Involvement of microsomal cytochrome P450 and cytosolic thymidine phosphorylase in 5-fluorouracil formation from tegafur in human liver. *Clin. Cancer Res.* 7(3),675-681.

⁴⁰ Jackman, J. E., Fierke, C. A., Tumey, L. N., Pirrung, M., Uchiyama, T., Tahir, S. H., Hindsgaul, O., and Raetz, C. R. H., (2000) .Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis in Gram-negative bacteria: inhibition of diverse UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylases by substrate-analogs containing zinc-binding motifs. *J. Biol. Chem.* 275, 11002-11009.

⁴¹ Givovich, A., Niemeyer, H .M., (1995). Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on five species of cereal aphids. *Entomol exp appl*, 74, 115–119.

⁴² Sylvia V. Copaja, S.V., Dave Nicol, D., Steve D. Wratten. S.D., (1999). Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination. *Elsevier*, 50, 17-24

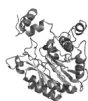
⁴³ Yale, H.L., (1943). The hydroxamic acids ,*Chemical reviews*, 33, 209-256.



- ⁴⁴ Masuyama, A., Akiyama, K., Okahara, M., (1987). Surface-active hydroxamic acids 2 : comparison of surface-properties of hydroxamic acids with ketones and methyl-esteres with similar hydrophilic and lipophilic structure. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64, 1040-1043.
- ⁴⁵ Fournand, D., Vaysse, L., Dubreucq, E., Arnaud, A., Galzy P. (1998). Monohydroxamic acid biosynthesis. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 5, 207-211.
- ⁴⁶ Pacheco, R., Karmali, A., Matos-Lopes, M. L. Serralheiro, M.L. (2005). Amidase encapsulated in TTAB reversed micelles for the study of transamidation reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23, 407-414.
- ⁴⁷ Prakash, O., Upadhyay, L.S.B., (2004). Acetohydroxamate inhibition of the activity of urease from dehusked seeds of water melon (*Citrullus vulgaris*). *Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 381-387.
- ⁴⁸ http://www.missionpharmacal.com/Global_Content/Package_Inserts/Lithostat.pdf (consultado em 17 de Outubro)
- ⁴⁹ Krishna, S. Hari; Srinivas, N. D.; Raghavarao, K. S. M. S., (2002). Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 75, 119-183.
- ⁵⁰ Jsselstijn, M.I., Kaiser, J., van Delft, F.L., Schoemaker, H.E., (2003). Synthesis of novel acetylene-containing amino acids. *Amino Acids*, 24, 263-266.
- ⁵¹ Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y., (2005) Comparison, applications, advantages, and limitations of immobilized and coated amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in HPLC. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2669-2680.



- ⁵² Xie, Y.C., Das, P.K., Klivanov, A.M., (2001) Excipients activate peroxidases in specific but not in non-specific reactions in organic solvents. *Biotechnology Letters* ,23 , 1451-1454.
- ⁵³ Zaks, A., Klivanov, A.M.,(1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 224 ,1249-1251.
- ⁵⁴ Zaks, A., Klivanov, A.M., (1985) .Enzyme-Catalyzed Processes In Organic-Solvents. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 82, 3192-3196.
- ⁵⁵ Carrea, G.,Riva, S.,(2000) .Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie-International Edition* , 39, 2226-2254 .
- ⁵⁶ Barros, R.J., Wehtje, E., Adlercreutz, P.,(2000) .Effect of mass-transfer limitations on the selectivity of immobilized alpha-chymotrypsin biocatalysts prepared for use in organic medium. *Biotechnology And Bioengineering* , 67 ,319-326.
- ⁵⁷ Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F., (1999). Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnology Advances*, 17, 293-318.
- ⁵⁸ Serralheiro, M. L.M. , Cabral, J.M.S., (1999). Irreversible thermoinactivation of α -chymotrypsin in buffer and water miscible organic solvent. Comparison with a reverse micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 191-205.
- ⁵⁹ Liu, Z., Shao, M., Cai, R., Shen. P., (2006). Online kinetic studies on intermediates of laccase-catalyzed reaction in reversed micelle. *Journal of Colloid and Interface Science*, 294, 122-128.



- ⁶⁰ Melo, E., Baptista, R., Cabral, J., (2003). Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 299-306.
- ⁶¹ Zhang, D., Guo, Z., Dong, X., Sun, Y., (2007). Characterization of Lipase in Reversed Micelles Formula F-3GA Modified Span 85. *Biotechnol, Prog.*, 23, 108-115.
- ⁶² Dias, A.I., Feliciano, A.S., Cabral, J.M.S., Prazeres, D.M.F., (2007). Chemical synthesis and crystallization of the dipeptide AcPheIleNH₂ in TTAB/heptane/octanol reversed micelles. *Colloid and Interface Science*, 305, 198-201.
- ⁶³ Puyou, M., Puyou, A., (1998). Enzymes in Low Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 53-89.
- ⁶⁴ Marhuenda-Edga, F., Velásquez, S., Cadenas, C., Cadenas, E., (2002). Reverse micelles in organic solvents: a médium for the biotechnological use of extreme halophilic enzymes at low salt concentration. *Archaea*, 1, 105-111.
- ⁶⁵ Pileni, M., (1993). Reverse Micelles as Microreactors. *The Journal of Physical of Chemistry*, 6961-6973.
- ⁶⁶ Silber, J., Biasutti, A., Abuin, E., Lissi, E., (1999). Interaction of small molecules with reverse micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 82, 189-252.
- ⁶⁷ Biswas, R. , Pal, S.K., (2004). Caging enzyme function: α -chymotrypsin in reverse micelle. *Biochem.* 387, 221-226.
- ⁶⁸ Carvalho, C., Cabral, J., (2000). Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82, 1063-1085.



- ⁶⁹ Biassutti, M., Abuin, E., Silber, J., Correa, N., Lissi, E., (2008). Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 136, 1-24
- ⁷⁰ Klyachko, N., Levashov, A., (2003). Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 179-186.
- ⁷¹ Chang, G., huang, T., Hung, H., (1999). Reverse Micelles as Life-Mimicking Systems. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)*, 24 (3), 89-100.
- ⁷² Ke, T. ; Klibanov, A.M., (1998). On enzymatic activity in organic solvents as a function of enzyme history. *Biotechnology And Bioengineering*, 5, 746-750 .
- ⁷³ Carneiro, A.F. (2003). Tese de Mestrado em Tecnologias de Fabricação - Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas. Escola de Engenharia- Departamento de Engenharia Têxtil .Portugal.
- ⁷⁴ Subramani, S., Shah , C., Madamwar , D.,(1996). Stability of Invertase in Reverse Micelles *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 60,33-39.
- ⁷⁵ Haris, P., Severcan, F., (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7, 207-221.
- ⁷⁶ Pacheco, R., Serralheiro, M., Karmali, A., Haris, P., (2003). Measuring enzymatic activity of a recombinant amidase using Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 322, 208-214.



⁷⁷ Karmali, K., Karmali, A., Teixeira, A., Marcelo Curto, M., (2004). The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Canavalia ensiformis*. *Analytical Biochemistry*, 331, 115-121.

⁷⁸ kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/biology.html(consultado em 09/07/2008)

⁷⁹ Brammar W.J. , Clarke P.H., (1964). Induction and repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase, *J. Gen Microbiol.* 37 ,307-319.

⁸⁰ Bradford, M.M, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 ,248–254

⁸¹ Hames, B.D. ,(1981) . An Introduction of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, in Gel Electrophoresis of proteins. (B.D. Hames and D. Rickwood Eds.) ,IRL Press, Oxford, 1-86.

⁸² Sasse, J. ,Gallagher, S.R.,(2003) .Current Protocols in Molecular Biology-Laboratory Manuals., *John Wiley & Sons*, New York.

⁸³ Matthews,B.W. ,(1993). Structural and genetic analysis of protein stability.*Annu. Rev. Biochem.*, 62, 139–160.

⁸⁴ Weert, M., Haris, P.I., Hennink, W.E., Crommelin, D.J.A., (2001). Fourier Transform Infrared Spectrometric analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors. *Analytical Biochemistry*, 297,160-169.

⁸⁵ Pelton, J.T., McLean, L.R.,(2000).Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry* 277,167-176.



⁸⁶ Haris, P.I., Chapman, D.,(1992).Does Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy provide useful information on protein structures. *Trends in biochemical sciences*.17 , 328-333.

⁸⁷ Surewicz, W.K. , Mantsch, H.H., Chapman, D., (1993).Determination of protein secondary structure by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy - a critical-assessment . *Biochemistry*, 32, 389-394.

⁸⁸ Haris, P.I., Lee, D.C.,Chapman, D.A.,(1986). Fourier-Transform Infrared investigation of the structural differences between ribonuclease-a and ribonuclease-s. *Biochimica Et Biophysica Acta* , 874, 255-265.

⁸⁹ Arrondo, J .L.R., Goni, F.M., (1993).Chapter 13 Infrared spectroscopic studies of lipid-protein interactions in membranes. *New Comprehensive Biochemistry*, 25,321-349.

⁹⁰ Surewicz, W.K., Mantsch, H.H.,(1988) . Conformational properties of angiotensin-ii in aqueous-solution and in a lipid environment - a Fourier-Transform Infrared Spectroscopic investigation . *Journal Of The American Chemical Society*, 110, 4412-4414.

⁹¹ Susi, H., Byler, D.M., (1986)Resolution-enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy of enzymes. *Methods In Enzymology* , 130 , 290-311.

⁹² Tamm, L.K., Tatulian, S.A., (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers . *Quarterly Reviews Of Biophysics*, 30 , 365-429.

⁹³ Jackson, M., Mantsch, H.H., (1991). Protein Secondary Structure From Ft-Ir Spectroscopy - Correlation With Dihedral Angles From 3-Dimensional Ramachandran Plots. *Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* ,69,1639-1642.



⁹⁴ Krimm, S. ,Bandekar, J., (1986) .Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.*, 8,181-364.

⁹⁵Toniolo,C., Palumbo, M.,(1977). Solid-State Infrared-Absorption Spectra And Chain Arrangement In Some Synthetic Homooligopeptides In Intermolecularly Hydrogen-Bonded Pleated-Sheet Beta-Conformation. *Biopolymers*,16,219-224.

⁹⁶ Haris, P.I., Chapman, D., Harrison, R.A., Smith, K.F., Perkins, S.J.,(1990). Conformational Transition Between Native And Reactive Center Cleaved Forms Of Alpha-1-Antitrypsin By Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy And Small-Angle Neutron-Scattering. *Biochemistry*, 29,1377-1380.

⁹⁷ Jackson, M., Haris, P.I., Chapman, D.,(1991). Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies of Ca²⁺ -Binding Proteins. *Biochemistry*, 30, 9681-9686.