



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE
D-HIDANTOINASE PARA A PRODUÇÃO DE
N-CARBAMOIL-D-FENILGLICINA**

ALINE APARECIDA BECARO

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
SETEMBRO DE 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE
D-HIDANTOINASE PARA A PRODUÇÃO DE
N-CARBAMOIL-D-FENILGLICINA**

ALINE APARECIDA BECARO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadoras: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano-DEQ
Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass-DQ

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
SETEMBRO DE 2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B388ie

Becaro, Aline Aparecida.

Imobilização e estabilização de D-Hidantoinase para a produção de N-Carbamoil-D-Fenilglicina / Aline Aparecida Becaro. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

103 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Biotecnologia. 2. Imobilização multipontual. 3. Enzimas.
I. Título.

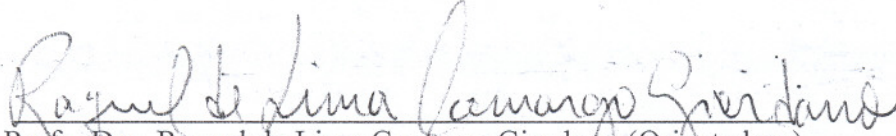
CDD: 660.6 (20^a)

ALINE APARECIDA BECARO

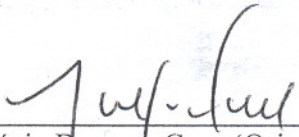
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/09/2008

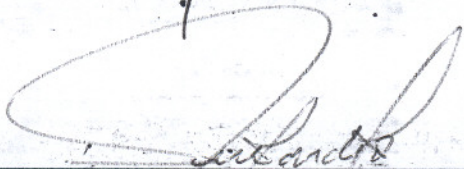
BANCA EXAMINADORA



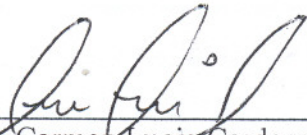
Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos – DEQ/UFSCar



Profa. Dra. Quézia Bezerra Cass (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos - DQ/UFSCar



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Universidade Federal de São Carlos – DEQ/UFSCar



Profa. Dra. Carmen Lucia Cardoso
Depto. Química – FFCLRP – USP

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais Paulo e Zildinha, a meu irmão Gustavo, ao meu namorado Dirceu e aos meus amigos.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras para enriquecerem com a sua ciência, e isso é negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras para edificarem os outros, e isso é amor.”

São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela vida, saúde, perseverança, fé, paciência e determinação para execução deste trabalho.

Aos meus pais Paulo e Zildinha e ao meu irmão Gustavo, por seu amor, carinho, suas palavras de incentivo e compreensão pelas minhas ausências e faltas.

A toda a minha família, avós, tios, primos e primas que me apoiaram nessa caminhada.

Ao Dirceu por sempre me apoiar, estar ao meu lado e compreender os meus sentimentos nos momentos mais difíceis.

Às Professoras Raquel de Lima Camargo Giordano e Quézia Bezerra Cass que tanto contribuíram para meu crescimento humano e profissional durante a orientação desta tese, pela paciência e toda dedicação.

Aos Professores Octávio Augusto Ceva Antunes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a Dulce Helena Ferreira de Souza da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimento especial ao amigo Wellington que durante todo o meu trabalho teve paciência, carinho, dedicação para ensinar, incentivar e consolar.

Agradecimento especial também a Fabiana pela amizade, companheirismo, paciência em ensinar e por todo tempo dedicado para o desenvolvimento deste trabalho.

A Kênia pela paciência, amizade, incentivo e acompanhamento nos experimentos importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também aos amigos: Adriano, Dasciana e Adilson por seu carinho, compreensão, por passarem um “pouquinho” dos seus conhecimentos e estarem sempre que possível dispostos a ajudar nas tarefas diárias e às vezes impossíveis.

Aos “amigos irmãos” André, Adans, Luana, Lucas (Lucão), Thiaguinho, Marcelo, Mauro, Michele, Guilherme, Rafael (Xila), Renan, que sempre estavam ali do lado nas horas em que mais precisei de um ombro amigo, por se preocuparem, pelas risadas, pelas broncas, pelas noites no laboratório, pelas lágrimas consoladas e também pelos momentos de descontração.

As amigas Bruna, Carolina e Ivana, pelo apoio, pelas risadas, pela amizade, companherismo e dedicação.

As amigas Liliam e Gleice que apesar do pouco tempo juntas deixaram o carinho, o incentivo e o mais importante à amizade.

A todos os amigos distantes Paulinho, Miguel, Thiago Martins, Adriana Cornelian, Carla Barroso, Cristiane Brito, Tiago Meloni, Lucas, Daniela Hikawa, Aline Mirelle, que mesmo pela distância a perfeição da amizade nunca se abalou e as palavras amigas sempre tiveram aquele significado especial.

Aos amigos de laboratório Anny, Danielle, Andréa, Ana Maria, Alice, Geísa, James, Juliana Teodoro, Marcelo, Mônica, Sandra, Vanessa, Juliana Teodoro, William, pelos momentos de trocas de idéia, descontração, incentivo e amizade.

Aos técnicos Amadeus, Edílson, Francisco (Espanhol) e Tiago.

A FAPESP pelo apoio financeiro de fundamental importância para realização deste trabalho.

Todos mereciam um agradecimento especial. Sinto-me na obrigação de agradecer a cada um, pois cada pessoa que passou nesse momento da minha vida, foi única. Deixou um pouco de si e levou um pouco de mim. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso. E foi durante essa jornada que aprendi que o mais estranho na vida é que choramos por tudo, pelo o que passamos pelo o que estamos passando e pelo o que ainda vamos passar, sabemos que coisas na vida são inexplicáveis. A amizade é um ótimo exemplo disso, todos sabemos que vamos ter muitos amigos, perder muitos e brigar com outros, mas sempre vai existir aquele algo especial. Amizades verdadeiras nunca se acabam, mas os amigos sempre se vão! É como disse um grande sábio: “A amizade é uma alma em dois corpos” (Aristóteles).

Considero-me uma pessoa de muita sorte, pois são muitos que tenho que agradecer. A todas as demais pessoas que de alguma forma me ajudaram, rezando, orando e torcendo por essa vitória. Todos estão em meu coração de uma maneira muito especial, **MUITO OBRIGADA.**

RESUMO: A imobilização e estabilização de enzimas aumentam muito o potencial de uso industrial desses catalisadores. D-hidantoinases (dihidropirimidina amidrohidrolase EC 3.5.2.2) são enzimas que catalisam a hidrólise de hidantoínas, com abertura do anel, para o correspondente N-carbamoil-D-aminoácido e são usadas na produção de D-aminoácidos, incluindo D-fenilglicina e D-p-hidroxifenilglicina. Este trabalho relata os estudos desenvolvidos para a imobilização e estabilização de D-hidantoinase de *Vigna angularis* (3.5.2.2.). Foram abordadas diferentes estratégias de imobilização multipontual em suportes orgânicos como quitosana e agarose. Diferentes protocolos de imobilização foram empregados, sendo adição de íons durante a redução com NaBH₄ importante para proteção do centro catalítico da enzima. Os derivados ativos e estabilizados foram empregados na reação de hidrólise da fenilhidantoína. O estudo de temperatura e pH de máxima atividade da enzima foi 60°C e pH 10,0. As subunidades da enzima apresentam peso molecular, com valor próximo a 50kDa. A enzima imobilizada em glioxil-agarose na presença dos íons Zn²⁺ durante a etapa de redução, com tempo de imobilização de 24 h foi o derivado mais estável sendo 89 vezes mais estável que a enzima solúvel. A análise de aminoácidos mostrou que aproximadamente 50% dos resíduos de lisina presentes na enzima foram covalentemente ligados no derivado de glioxil-agarose. A enzima imobilizada em quitosana-alginato-epoxilado foi 20 vezes mais estável que a enzima solúvel. Todos os procedimentos de imobilização testados levaram a 100% de rendimento de imobilização. Enzima solúvel e os melhores derivados obtidos por imobilização em glioxil e quitosana foram usados na catálise da hidrólise de fenilhidantoína, produzindo 99% de N-Carbamoil-D-fenilglicina nos tempos de 3, 9 e 15 h, respectivamente.

Palavras-chave: Imobilização multipontual, D-Hidantoinase, glioxil-agarose, epóxi-quitosana-alginato, N-Carbamoil-D-fenilglicina.

ABSTRACT: Immobilization and stabilization of enzymes increases their potential for use in industrial scale. D-hydantoinases (dihidropirimidina amidrohidrolase EC 3.5.2.2) catalyze the hydrolysis of D-hydantoin, generating the corresponding N-carbamoyl-D-amino acid and are used in the production of D-amino acids, including D-phenylglycine and D-p-hydroxyphenylglycine. This work reports studies for immobilization and stabilization of D-hydantoinase from *Vigna angularis* (E.C. 3.5.2.2.). Different strategies of multipoint covalent attachment in organic supports as chitosan and agarose were used. Different protocols of immobilization were employed, being the addition of ions during the reduction step with the NaBH₄ important to protect enzyme catalytic site. The active and stabilized derivatives were used to catalyze the hydrolysis of D-phenylhydantoin. The temperature and pH enzyme profiles showed maximum enzyme activity at 60°C and pH 10,0. The subunits of the enzyme present molecular mass around 50kDa. The enzyme immobilized in glyoxyl-agarose in the presence of Zn²⁺ ions during the reduction step, with immobilization time of 24h, was the best derivative, being 89-fold more stable than the soluble enzyme. The analysis of amino acids showed that a 50% of lysines residue present in the enzymes was covalently linked in glyoxyl-agarose. The enzyme immobilized in epoxy-chitosan-alginate was 20-fold more stable than the soluble enzyme. All the tested immobilization protocols led to 100% of immobilization yield. Soluble enzyme and the best glyoxyl and chitosan enzyme derivatives were used to catalyze the hydrolysis of D-phenylhydantoin, and led to the production of 99% of N-Carbamoyl-D-Phenylglycine after 3, 9 and 15h of reaction respectively.

Keywords: multipoint immobilization, D-hydantoinase, glyoxyl-agarose, epoxy-chitosan-alginate, N-carbamoyl-D-phenylglycine

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	4
2.2 ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES	7
2.3 D-HIDANTOINASE.....	9
2.4 IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS	11
2.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	12
2.5.1 Adsorção Física	13
2.5.2 Encapsulação	13
2.5.3 Ligação Covalente	13
2.6 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	15
2.6.1 Quitosana	16
2.6.2 Agarose.....	19
2.7 MÉTODOS DE ATIVAÇÃO DE SUPORTES	20
2.8 IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL DE ENZIMAS EM GEL DE AGAROSE	22
2.9 VARIÁVEIS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR LIGAÇÃO COVALENTE MULTIPONTUAL.....	24
2.9.1 Efeito do Grau de Ativação do Suporte.....	24
2.9.2 Efeito das Condições de Reação.....	25
2.9.2.1 Temperatura.....	25
2.9.2.2 pH	25

2.9.2.3 Tempo de Imobilização	26
2.9.2.4 Tampão	26
2.9.3 Derivados de D-Hidantoinase quimicamente modificados com Dextranas	27
2.10 MÉTODO DE SEPARAÇÃO: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	28
2.10.1 Cromatografia Quiral.....	29
2.10.2 Modos de eluição.....	30
2.10.3 Parâmetros Cromatográficos	31
2.10.4 Antibióticos Macrocíclicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
3.2.1 Caracterização das propriedades bioquímicas de D-hidantoinase solúvel	36
3.2.1.1 Influência da temperatura	36
3.2.1.2 Influência do pH	36
3.2.2 Preparação de géis gliceril.....	36
3.2.3 Eterificação de géis.....	37
3.2.4 Preparação do gel glutaraldeído-agarose.....	38
3.2.5 Quantificação de grupos aldeídos em glioxil-agarose.....	38
3.2.6 Imobilização de D-hidantoinase em gel glioxil-agarose e em glutaraldeído-agarose	39
3.2.7 Preparação de géis de quitosana-alginato.....	39
3.2.8 Quantificação de grupos aldeídos em glioxil-quitosana-alginato.....	39
3.2.9 Preparação de epóxi-quitosana-alginato	40

3.2.10	Determinação da quantidade de epóxidos nos suportes	40
3.2.11	Imobilização de D-hidantoinase em glioxil-quitosana ativados com glicidol e epóxi-quitosona-alginato	41
3.2.12	Acompanhamento do processo de imobilização por meio do rendimento e atividade recuperada	41
3.2.13	Preparação dos polialdeídos pela oxidação da dextrana.....	42
3.2.14	Estabilização com poldextrans	42
3.2.15	Determinação da concentração de proteína.....	43
3.2.16	Determinação da atividade da D-hidantoinase livre.....	43
3.2.17	Determinação da atividade da D-hidantoinase imobilizada	43
3.2.18	Estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada.....	44
3.2.19	Análise de aminoácidos de D-hidantoinase solúvel e imobilizada	44
3.2.20	Estimativa da carga máxima de hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose e epóxi-quitosona-alginato	45
3.2.21	Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS-PAGE.....	45
3.2.22	Preparo das amostras injetadas nos cromatógrafos	46
3.2.23	Protocolo padrão para produção do N-carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise básica da D,L-fenilhidantoína.....	46
3.2.24	Caracterização do N-carbamoil-D-fenilglicina através da técnica de infravermelho.	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA SOLÚVEL	48
4.1.1	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	48
4.1.2	Efeito do pH sobre a atividade enzimática	49
4.2	IMOBILIZAÇÃO DA D-HIDANTOINASE EM GEL GLIOXIL-AGAROSE 6BCL.....	49

4.2.1 Utilização de íons bivalentes como protetores da D-hidantoinase	52
4.2.2 Influência do tempo de imobilização na presença de zinco durante a redução....	54
4.2.3 Uso de ácido hidantóico na imobilização e de íons na etapa de redução	56
4.2.4 Influência do tempo de imobilização na presença de ácido hidantóico e Mg^{2+} ...	59
4.3 IMOBILIZAÇÃO DA D-HIDANTOINASE EM GÉIS DE QUITOSANA	60
4.4 AVALIAÇÃO DO GRAU DE INTERAÇÃO ENTRE ENZIMA E SUPORTE.....	63
4.5 CAPACIDADE MÁXIMA DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EM GÉIS DE AGAROSE E EPÓXI-QUITOSANA-ALGINATO	64
4.6 ELETROFORESE DA ENZIMA LIVRE	66
4.7 ELETROFORESE DA ENZIMA IMOBILIZADA	67
4.8 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS D,L-FENILGLICINA.....	68
4.8.1 Avaliação da coluna T (Chirobiotic T 250 x 4,6 mm, 10 μ m Astec) para a separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina.	68
4.8.2 Avaliação da coluna TAG (Chirobiotic TAG 250 x 4,6 mm, 10 μ m Astec) para a separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina.	70
4.8.3 Avaliação da performance das colunas de antibiótico na separação dos enantiômeros da D,L- fenilglicina.	72
4.9 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS D,L-FENILHIDANTOÍNA	73
4.10 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA FENILHIDANTOÍNA PARA A PRODUÇÃO DO N-CARBAMOIL-D-FENILGLICINA	74
4.10.1 Hidrólise da Fenilhidantoína pela Enzima Livre.....	74
4.10.2 Hidrólise de D,L-Fenilhidantoína pela Enzima Imobilizada em Glioxil-agarose6BCL	75
4.10.3 Hidrólise de D,L-Fenilhidantoína catalisada pela enzima imobilizada em Quitosana-Alginato-Epoxilada.	78

4.10.4 Cinética Reacional e Seletividade da Enzima na Hidrólise da D,L-Fenilhidantoína com a Enzima Livre e Imobilizada.....	80
4.11 ESTUDO DA RACEMIZAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA D,L-FENILHIDANTOÍNA.....	82
4.12 CARACTERIZAÇÃO DO N-CARBAMOIL-D-FENILGLICINA POR ANÁLISE DE SEU ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	83
4.13 VERIFICAÇÃO DA ESTEREOSSELETIVIDADE DA ENZIMA D-HIDANTOINASE NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA D,L-FENILHIDANTOÍNA.....	85
5 CONCLUSÕES.....	87
6 SUGESTÕES	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura geral das penicilinas	4
Figura 2.2. Modelo esquemático da síntese química de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos.	5
Figura 2.3. Síntese de D,L-fenilglicina.	7
Figura 2.4. Síntese de D-fenilglicina a partir de D,L-N-acetil-fenilglicina	7
Figura 2.5. Diagrama da hidrólise de D-hidantoína por D-hidantoinase e síntese do carbamoil.	9
Figura 2.6. Síntese de D-carbamoil a partir de D-hidantoinase.....	10
Figura 2.7. Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.	15
Figura 2.8. Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana.....	17
Figura 2.9. Estrutura química da agarose.	19
Figura 2.10. Estrutura dos macrosporos da Agarose.	20
Figura 2.11 Representação dos métodos de ativação	22
Figura 2.12. Sistema de imobilização proposto por GUIÁN (1988).	23
Figura 2.13 Reação enzima (amino)-suporte (aldeído) - Formação da Base de Schiff.....	23
Figura 2.14 Preparação de polidextranas.....	28
Figura 2.15. Esquema de um cromatograma com medidas relacionadas aos cálculos dos parâmetros cromatográficos.	32
Figura 2.16. Esquema da Subdivisão dos antibióticos macrocíclicos	33

Figura 2.17. Estrutura molecular de alguns antibióticos macrocíclicos: (A) Vancomicina, (B) Teicoplanina e (C) Ristocetina A.....	34
Figura 3.1 Formação de grupos reativos no suporte por glicidol.....	37
Figura 3.2. Foto representativa da reação de hidrólise: (A) sistema completo e (B) somente o reator e agitador mecânico.....	47
Figura 4.1. Influência da temperatura sobre a atividade da D-Hidantoinase solúvel.....	48
Figura 4.2. Influência do pH na atividade da D-Hidantoinase livre medido a 30°C.....	49
Figura 4.3. Acompanhamento da cinética de imobilização de D-hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose 6% a 25°C, pH 10,05, na ausência de ácido hidantóico.....	50
Figura 4.4. Inativação térmica a 70°C, de D-hidantoinase solúvel e de seus derivados em gel glioxil-agarose 6BCL com ■ enzima livre, • 3h, ▲ 24h e ▼ 48h de imobilização.....	51
Figura 4.5. Inativação térmica a 70°C, de derivados de D-hidantoinase imobilizados em glioxil-agarose 6% BCL e glutaraldeído-agarose, reduzidos na presença de Mn^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+}	54
Figura 4.6. Inativação térmica da D-hidantoinase a 70°C em diferentes tempos de imobilização.....	56
Figura 4.7. Inativação térmica de D-hidantoinase a 70°C, na presença de ácido hidantóico durante a imobilização e íons protetores durante etapa de redução com borohidreto.....	58
Figura 4.8. Influência do carregamento de proteína sobre a concentração de proteína imobilizada em glioxil-agarose (A) e em epóxi-quitosana-alginato (B).....	65
Figura 4.9 Influência do carregamento de proteína sobre a efetividade (relação entre a atividade aparente (observada) e a atividade na ausência de limitações difusionais (teórica) em géis glioxil-agarose (A) e epóxi-quitosana-alginato (B).....	66
Figura 4.10. Eletroforese desnaturante da enzima livre.....	67

- Figura 4.11. Eletroforese desnaturante da enzima imobilizada..... 68
- Figura 4.12. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min e $\lambda=210\text{nm}$ 69
- Figura 4.13. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel. 70
- Figura 4.14. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic TAG (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min e $\lambda=210\text{nm}$ 71
- Figura 4.15. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic TAG (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (40:60), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel. 72
- Figura 4.16. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D,L-fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel. 74
- Figura 4.17. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína catalisada pela enzima livre..... 75
- Figura 4.18. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glioxil-agarose da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: C-18 (3,9x300 mm, 10 μm , Waters), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ 76
- Figura 4.19. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glioxil-agarose da mistura racêmica de D-L-

- Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min , $\lambda=210\text{nm}$ 77
- Figura 4.20. Separação dos cromatogramas nos tempos de hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glioxil-agarose 77
- Figura 4.21. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise da mistura racêmica catalisada pela enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: C-18 (3,9x300 mm, 10 μm , Waters), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min , $\lambda=210\text{nm}$ 78
- Figura 4.22. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min , $\lambda=210\text{nm}$ 79
- Figura 4.23. Separação dos cromatogramas nos tempos de hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glioxil-agarose da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min , $\lambda=210\text{nm}$ 80
- Figura 4.24. Cromatogramas ilustrativos da comparação da cinética reacional da hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoína com 2 horas de reação para a enzima livre (A); imobilizada em agarose (B) e imobilizada em quitosana (C). 81
- Figura 4.25. Cromatograma de Racemização da forma enantiomérica L para a forma D. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min , $\lambda=210\text{nm}$ 83
- Figura 4.26. Espectro na região do infravermelho da mistura D,L-fenilhidantoína..... 84
- Figura 4.27. Espectro na região do infravermelho do N-carbamoil-fenilglicina..... 85
- Figura 4.28. (A) Cromatograma do produto formado na reação de hidrólise e, (B) Cromatograma de separação da D,L-Fenilhidantoína. 86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Mercado mundial de enzimas e aplicação.	8
Tabela 2.2. Aplicações da quitosana em diferentes áreas.....	18
Tabela 2.3. Atividade recuperada e fator de estabilidade para diversas enzimas imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose.....	24
Tabela 2.4. Dextranas disponíveis de Fluka e Sigma.....	27
Tabela 4.1. Influência de íons na atividade e estabilidade durante a redução dos derivados de D-hidantoinase, imobilizados em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 por 3h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.	53
Tabela 4.2. Influência do tempo de imobilização dos derivados de D-hidantoinase imobilizados em glioxil-agarose na presença de íons Zn^{2+} na etapa de redução a 25°C, pH 10,05, com $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.	55
Tabela 4.3. Influência do ácido hidantóico na atividade e estabilidade durante imobilização e redução derivados de D-hidantoinase na presença de íons, imobilizados em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 por 3 h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.	57
Tabela 4.4 Influência do tempo de imobilização de D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-agarose na presença de ácido hidantóico na imobilização e íon Mg^{2+} na etapa de redução em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h.....	60
Tabela 4.5. Imobilização de D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-quitosana- alginato e quitosana-alginato-epoxilada na ausência ou na presença do íon Mg^{2+} ou ácido hidantóico a 25°C, pH 10,05 por 3 h e/ou 24h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ a 70°C.....	61
Tabela 4.6. Comparação entre percentual de aminoácidos quantificados para D-hidantoinase livre e imobilizada em agarose na presença de íons Zn^{2+} e Mg^{2+} durante a etapa de redução no tempo de imobilização de 3h.	63

Tabela 4.7. Testes realizados na Coluna T com os parâmetros cromatográficos.....	69
Tabela 4.8. Testes realizados na Coluna TAG com os parâmetros cromatográficos	71
Tabela 4.9. Resultados de seletividade da enzima D-Hidantoinase na hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoína e formação preferencial do produto N-carbamoil-D-fenilglicina.....	82

NOMENCLATURA

PGA	Penicilina G acilase
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Chirobiotic T	Coluna de antibiótico de Teicoplamina
Chirobiotic TAG	Coluna de antibiótico de Teicoplamina aglycon
EDA	Etilenodiamina
PDAB	Dimetilbenzaldeído
TCA	Ácido Tricloroacético
PITC	Fenilisocianato
PTC	Feniltiocarbamil
CPA	Carboxipeptidase A
IV	Infravermelho

1 INTRODUÇÃO

Antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos estão entre os fármacos de maior uso em escala mundial (GIORDANO et al, 2006). Esses antibióticos apresentam em sua estrutura molecular um anel β -lactâmico, responsável por sua atividade antimicrobiana. Dentre os antibióticos de maior destaque, podem ser citadas as penicilinas e cefalosporinas (amoxicilina, ampicilina, cefalexina, cefadroxil, cefazolina, dentre muitos outros) que não tem seu princípio ativo produzido atualmente no Brasil (HAKIMELAHY et al, 2002).

Os processos industriais de fabricação desses fármacos, estabelecidos a partir de 1960, empregam rotas químicas. A produção mundial desses antibióticos se deslocou, a partir de 1980, dos EUA e Europa ocidental para países como Índia, China, México, Venezuela, não só devido à redução dos custos da mão-de-obra, mas também devido ao alto grau de insalubridade de reagentes e solventes empregados e o impacto ambiental dos resíduos produzidos por esses processos. Com efeito, a principal rota atual para produção, por exemplo, de ampicilina e amoxicilina, é a do “sal de Dane” (DANE e DOCKNER, 1964), que utiliza diclorometano como solvente, além de piridina, dietilamina, trietilamina, acetona, ácido pivalico etc (GROSSMAN e HARDCASTLE, 1976).

A partir de 1990, intensas pesquisas acadêmica e industrial vêm sendo dirigidas para a busca de rotas alternativas da produção de enantiômeros puros por rota química pela via enzimática (MAY et al, 2000). Estes biocatalisadores por atuarem em condições fisiológicas e em meio aquoso são atraentes para aplicações em processos industriais, pois possibilita uso de pequeno volume de enzima no reator em relação ao volume total a processar, com conseqüente redução de custos fixos e variáveis em relação aos catalisadores químicos tradicionais. Além disso, a alta seletividade das enzimas permite catalisar especificamente uma única transformação sobre complexos que contenham vários grupos funcionais com reatividade similar, tornando-as úteis em processos complexos de química fina tais como: oxidações, condensações e hidrólises seletivas. Finalmente, a elevada especificidade frente ao substrato faz com que as enzimas possam modificar somente um só tipo de substrato dentro de uma mistura complexa de compostos similares e, inclusive, são capazes de diferenciar entre os estereoisômeros de um composto quiral (FOSTER et al, 2003; KRAJEWSKA, 2004).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão grande, devido à sua baixa estabilidade nas condições usualmente empregadas. Além disso, por serem potentes catalisadores, podem estar

presentes, na forma solúvel, em pequena quantidade no meio, o que torna inviável economicamente sua recuperação e reutilização. A imobilização e estabilização das enzimas (engenharia da enzima) é uma etapa importante, pois permite superar as desvantagens da perda da enzima em meio aquoso e da instabilidade operacional no uso industrial das enzimas, tornando-as catalisadores ideais para a produção e transformação de compostos bioativos, seja na indústria alimentícia, de química fina ou farmacêutica.

Como exemplo de enzimas utilizadas em escala industrial, pode-se citar a penicilina G acilase (PGA) aplicada na síntese de ampicilina. Nessa síntese, a enzima penicilina G acilase catalisa a condensação do núcleo β -lactâmico, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), com o éster metílico de fenilglicina, empregado como cadeia lateral, sintetizado quimicamente. A substituição da rota química pela rota enzimática passa assim pela síntese enzimática da cadeia lateral, o que pode ser parcialmente obtido com o uso da enzima D-hidantoinase (CARDIAS, 2000).

As D-hidantoinases (dihidropirimidina amidrohidrolase EC 3.5.2.2) são enzimas que catalisam a hidrólise de hidantoínas, com abertura do anel, para o correspondente N-carbamoil-D-aminoácido. Esse pode ser convertido em D-aminoácido por diazotação ou por um segundo estágio de hidrólise enzimática usando N-carbamoil-aminoácido amidohidrolase. Em biotecnologia industrial, essas enzimas são largamente usadas na produção de D-aminoácidos, incluindo D-fenilglicina e D-p-hidroxifenilglicina. Na síntese química dos D-aminoácidos são produzidos os enantiômeros da fenilglicina e o uso da enzima D-hidantoinase permitiu evitar a etapa de resolução racêmica dos enantiômeros devido a sua capacidade enantioseletiva, gerando apenas o enantiômero D (LEE e FAN, 1999). Portanto a síntese desses aminoácidos é muito importante por estes serem precursores na síntese de antibióticos semi-sintéticos, hormônios peptídicos, piretróides e inibidores enzimáticos (SYLDATK, 1999; ARCURI et al, 2000; ALTENBUCHNER et al, 2001; OGAWA e SHIMIZU, 2002).

A pequena contribuição de processos enzimáticos em escala industrial é o resultado da ausência de estudos integrais que solucionem problemas existentes quando se propõe utilizar rotas enzimáticas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a obtenção de derivados ativos e estabilizados termicamente de D-hidantoinase, imobilizados multipontualmente nos suportes orgânicos quitosana e agarose, e seu uso em reações de síntese de N-carbamoil-D-fenilglicina, um intermediário da D-fenilglicina, empregado como cadeia lateral na síntese de antibióticos β -lactâmicos. Os suportes foram ativados por diferentes protocolos, empregando-se glicidol, epiclorigrina e glutaraldeído.

A imobilização da D-hidantoinase foi conduzida na presença de ácido hidantóico e verificada a adição do ácido sobre as propriedades catalíticas dos derivados. Neste estudo também foi avaliado o efeito da adição de íons metálicos bivalentes na etapa de redução dos derivados com NaBH_4 . Os derivados com maiores atividades hidrolíticas e termoestáveis foram empregados na hidrólise da D-L-fenilhidantoína para a síntese do precursor da D-fenilglicina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos β -Lactâmicos

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de alguns microorganismos que inibem o processo de crescimento de outros organismos. Antibióticos β -lactâmicos são a classe de fármacos mais utilizada mesmo em concentrações muito pequenas agem como agentes quimioterápicos, por serem metabólitos fortemente ativos e desde o descobrimento da penicilina, é a família de antibacterianos mais importante (HAKIMELAHI et al, 2002; GIORDANO et al, 2006).

Os β -lactâmicos constituem um grupo de substâncias caracterizadas pela presença de um grupo denominado anel β -lactâmico. Este anel é essencial para atividade antimicrobiana e a cadeia lateral determina o espectro de atividade e as propriedades farmacocinéticas do composto. A composição de todas as penicilinas apresenta um núcleo comum, de acordo com a fórmula representada na Figura 2.1.

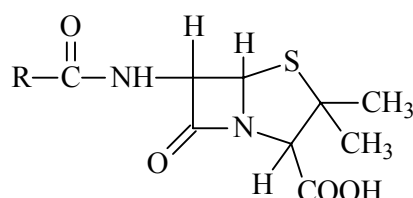


Figura 2.1. Estrutura geral das penicilinas

A penicilina é produzida industrialmente por fermentação aeróbia, utilizando-se o fungo *Penicillium chrysogenum*, em reatores agitados, com aeração, operados de forma semi-descontínua, isto é, alimentação contínua de várias substâncias a uma fermentação descontínua (MENEZES et al, 2000).

Nas últimas décadas, melhorias nos organismos produtores de penicilinas, como *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum*, aumentaram a produtividade e reduziram os custos, em uma porcentagem bem significativa (ELANDER, 2003). A penicilina obtida unicamente por fermentação não apresenta a mesma eficiência e propriedades farmacocinéticas quando comparada as penicilinas semi-sintéticas que possuem melhor estabilidade e adsorção para uso oral (CARDIAS, 2000).

A síntese de penicilinas semi-sintéticas não é realizada industrialmente pela via enzimática, mas pela via química (CARDIAS, 2000). O processo convencional usa uma complexa série de reações químicas que requer a proteção de grupos reativos que podem reagir durante a etapa de acilação do núcleo (apresentam riscos de racemização e reações laterais) Para impedir essa reação são usados solventes tóxicos, nocivos ao meio ambiente

(acilclorados) e baixas temperaturas (-40°C) conforme representado na Figura 2.2 (CAO et al, 2001; FERREIRA et al, 2004).

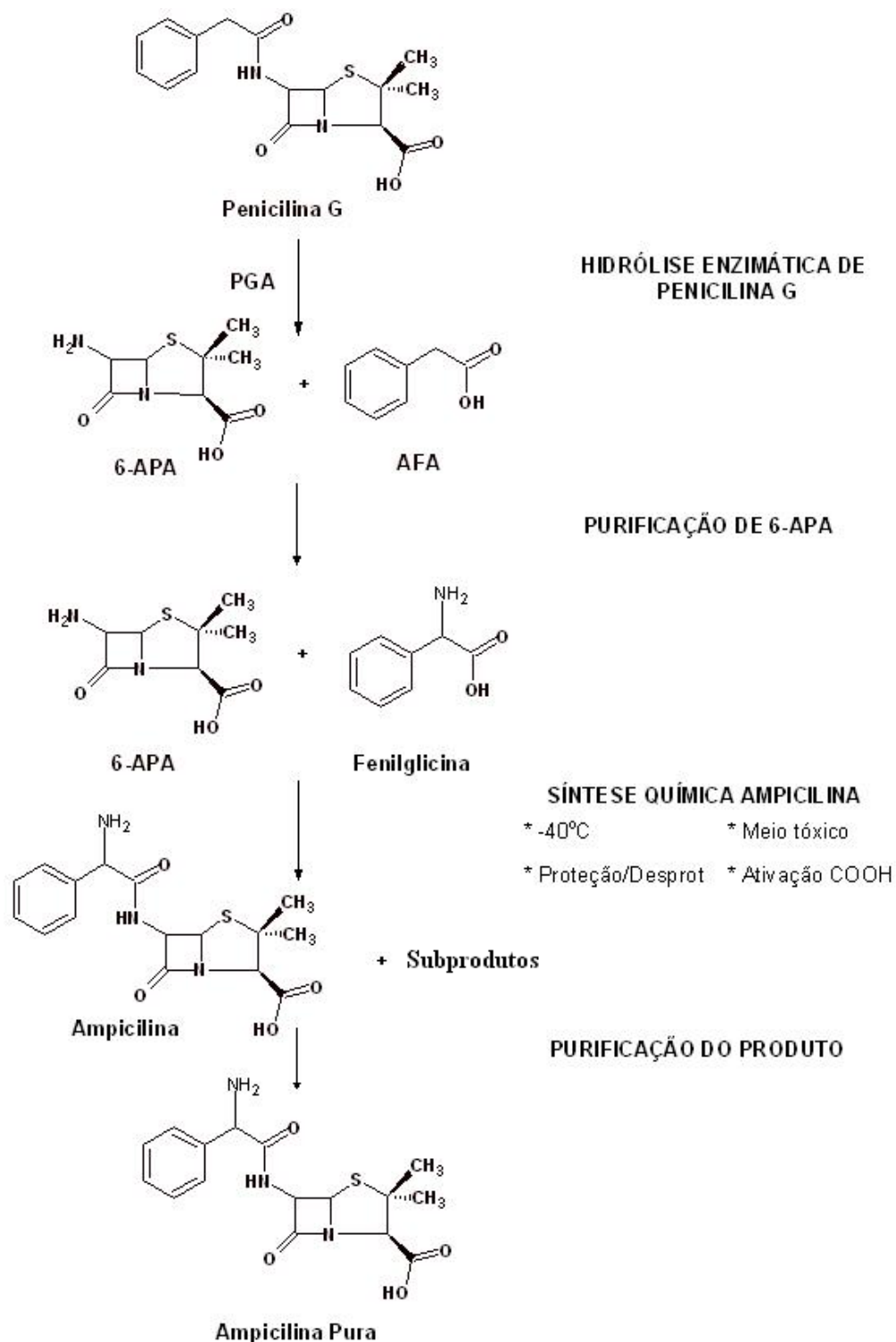


Figura 2.2. Modelo esquemático da síntese química de antibióticos β-lactâmicos semi-sintéticos (CARDIAS, 2000).

Como exemplo de acilclorados tem o cloreto de metileno e dimetilalanina (OPSINA et al, 1996). Estes solventes são indesejáveis como impurezas ou resíduos na produção de antibióticos (FERREIRA et al, 2004).

A síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos apresenta vantagens operacionais em relação ao método químico convencional, pois ocorre em condições suaves de temperatura, pressão e pH, além de não requerer proteção dos grupos reativos devido à especificidade enzimática pelo substrato (BRUGGINK et al, 1998; CARDIAS, 2000). O acoplamento do núcleo a diferentes cadeias laterais, utilizando enzimas como catalisador, permitiria a solução dos inconvenientes expostos acima, porém a produção enzimática é inferior à produção química (FERREIRA et al, 2004).

Distintos antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos são produzidos pela indústria farmacêutica. Esses compostos tais como a ampicilina e amoxicilina são preparados pela acilação do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) derivado da penicilina G ou penicilina V, como demonstrados na Figura 2.2 (CARDIAS, 2000). As cefalosporinas correspondem a 65% da produção total de antibióticos (ELANDER, 2003).

Hidantoínas racêmicas são as principais fontes de D-L-aminoácidos intermediários para a síntese de antibióticos β -lactâmicos, pesticidas, fármacos e peptídeos biologicamente ativos (MARTINEZ-RODRIGUES et al, 2004). A preparação destes aminoácidos tem sido foco de inúmeros estudos tanto químicos quanto biológicos, oferecendo alternativas para a indústria farmacêutica. Um dos aminoácidos de interesse para a indústria de penicilinas semi-sintéticas é a D-Fenilglicina (LOUWRIER e KNOWLES, 1997).

Normalmente, a síntese de fenilglicina é realizada por rota química. Machado et al (2005) descreveram o processo de produção de D,L-fenilglicina. O aminoácido é sintetizado a partir de benzaldeído que origina o derivado D,L-N-acetil-fenilglicina. A Figura 2.3 apresenta sua síntese. Este aminoácido tem importância na síntese de antibióticos β -lactâmicos. A demanda desse aminoácido, junto com o D-p-hidroxifenilglicina, aumentou devido à intensa utilização na produção de fármacos (GOKHALE et al, 1996).

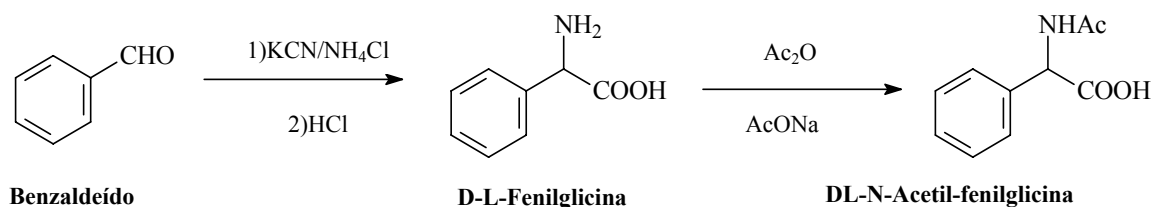


Figura 2.3. Síntese de D,L-fenilglicina (MACHADO et al, 2005).

Após a síntese química da DL-N-acetil-fenilglicina, a enzima acilase I de rim suíno foi empregada na hidrólise enantiomérica para a síntese de D-N-acetil-fenilglicina. A resolução de DL-N-acetil-fenilglicina foi realizada a 40°C por 30 min, com conversão de 50%. A L-fenilglicina produzida foi isolada do meio reacional empregando uma coluna de resina de troca catiônica. A fração de D-N-acetil-fenilglicina foi submetida à hidrólise ácida empregando HBr como catalisador e o substrato foi convertido em D-fenilglicina, com rendimento de 26%, como mostrado na Figura 2.4.

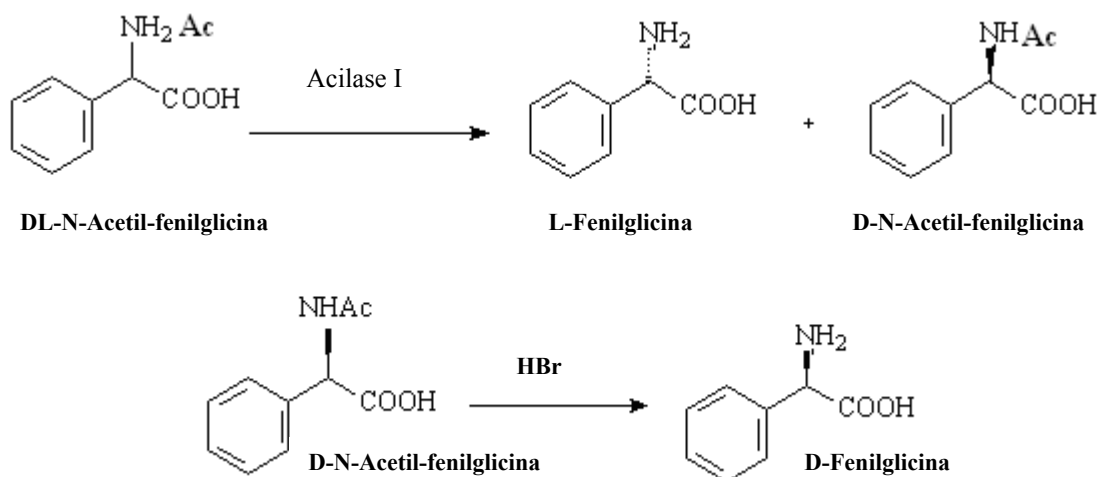


Figura 2.4. Síntese de D-fenilglicina a partir de D,L-N-acetil-fenilglicina (MACHADO et al, 2005).

2.2 Enzimas como Biocatalizadores

Na indústria para a obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial, são empregados catalisadores químicos que são pouco versáteis, exigem altas temperaturas para que a reação atinja razoável velocidade de reação e possuem baixa especificidade oferecendo produtos de composição química mista que requerem uma etapa posterior de purificação (KRAJEWSKA, 2004). A vantagem no uso de enzimas como catalisadores nestas reações, reduziria o custo final do processo devido ao consumo menor de energia,

redução na formação de subprodutos indesejáveis, por terem uma elevada especificidade que resulta em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução da quantidade de resíduos.

Nesse contexto, o enfoque biotecnológico, vem se apresentando como uma opção interessante para sua exploração em diversos tipos de reações. As enzimas utilizadas nos setores industriais são na sua grande maioria produzidas por microrganismos. A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos e dentre outras aplicações.

De acordo com a reportagem da Business Communications Company, Inc. o mercado global de enzimas de interesse industrial foi em U\$ 2 bilhões de dólares em 2004 (RAJAN, 2004). O crescimento no mercado de enzimas é de aproximadamente 3 a 4% ao ano, acompanhada pela redução de preço, devido ao grande número de empresas que atualmente comercializam enzimas com preços competitivos. A estimativa do mercado de enzimas para 2009 foi avaliada em U\$ 2,4 bilhões de dólares (RAJAN, 2004).

Este mercado se divide em três segmentos de aplicação: enzimas técnicas, enzimas utilizadas por indústrias de alimentos e para alimentação animal. Enzimas técnicas são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos, aproximadamente 50% do total de enzimas comercializadas encontra-se neste mercado. A Tabela 2.1. apresenta os principais consumidores de enzimas e o valor agregado gasto anualmente por estes setores

Tabela 2.1. Mercado mundial de enzimas e aplicação (milhões de dólares).

Aplicação	2002	2003	2004	2009	Crescimento anual (%)
Técnica	978,2	1009,2	1040,0	1222,0	3,3
Alimentos	701,0	720,0	740,0	863,0	3,1
Ração animal	210,8	215,6	220,0	267,0	3,9
Total	1890,0	1945,0	2000,0	2352,0	3,3

Fonte: RAJAN (2004).

As proteases são as enzimas mais utilizadas no setor industrial (40%) seguindo as carboidrases e as lipases (SHARMA et al, 2001). O mercado consumidor que mais cresce é aquele destinado à alimentação de animais, em torno de 4% ao ano, parte dessas são

utilizadas na produção de xarope de açúcar invertido e outra parcela para a produção de compostos aromatizantes (HASAN et al, 2006).

2.3 D-Hidantoinase

Hidantoinases pertencem à família das ureases. Requerem dois íons metálicos para exibirem atividade catalítica e todos os aminoácidos ligantes nos metais são conservados (KISHAN et al, 2005). Até agora quatro estruturas de D-hidantoinases foram reportadas por diferentes fontes, como sendo um tetrâmero (ABENDROTH et al, 2002; CHEON et al, 2002; XU et al, 2003) e segundo CHUNG et al (2001) ao estudarem a hidantoinase de *Methanococcus jannaschii* determinou-se que esta é uma proteína homotetramérica.

A D-hidantoinase específica converte D-L-5 hidantoína monosubstituída racêmica para o D-N-Carbamoil aminoácido (LEE e FAN, 1999), como esquematizado na Figura 2.5.

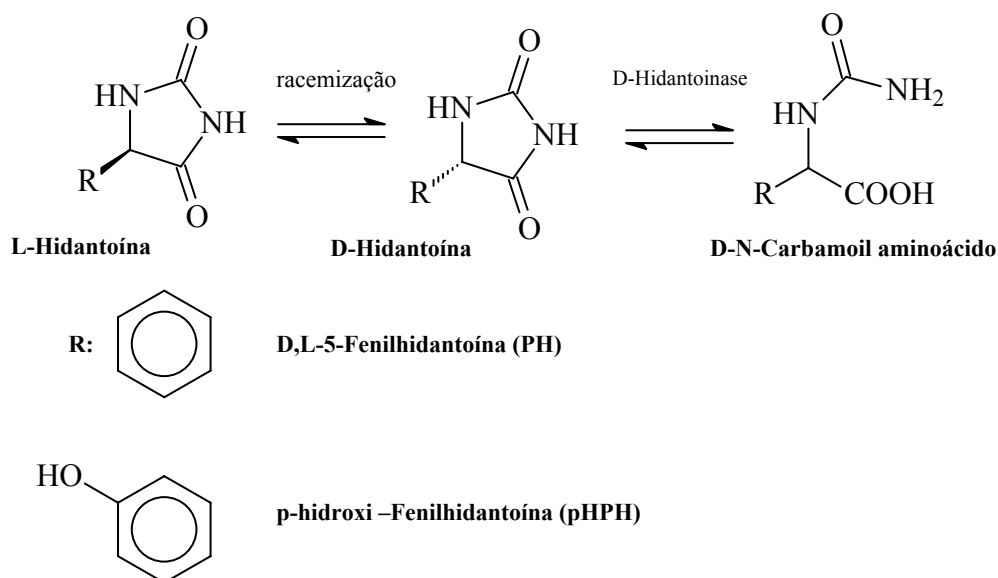


Figura 2.5. Diagrama da hidrólise de D-hidantoína por D-hidantoinase e síntese do carbamoil (FAN e LEE, 1999).

É uma das enzimas mais usadas no processo de produção de D-aminoácidos (CHEON et al, 2000). O N-carbamoil-D-aminoácido pode ser convertido para o D-aminoácido por diazotação ou por uma segunda enzima, a N-carbamoil amidohidrolase (ARCURI et al, 2002; ARCURI et al, 2004; JIA et al, 2006). A utilização de D-hidantoinase permitiria também evitar a etapa de resolução racêmica dos enantiômeros da fenilglicina produzidos pela síntese química, pois a enzima é enantioesletiva, gerando o enantiômero D puro ou enriquecido, conforme a Figura 2.6.

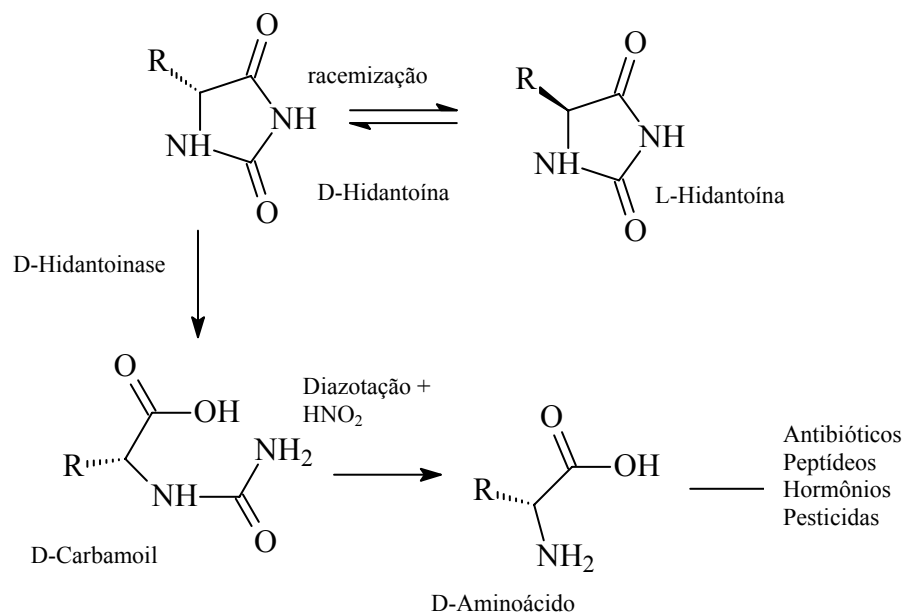


Figura 2.6. Síntese de D-carbamóil a partir de D-hidantoinase

A transformação microbiana de D,L-5 hidantoína monosubstituída é aplicada em escala industrial na produção de aminoácidos opticamente ativos. Hidantoinase e N-carbamóil amino hidrolase são enzimas responsáveis por esta transformação e as principais fontes de obtenção destas enzimas são *Agrobacterium tumefaciens* (DURHAM e WEBER, 1995), *Pseudomonas* sp. (SUDGE et al, 1998), *Agrobacterium radiobacter* (CHAO et al, 2000), e plantas (FAN e LEE, 2001).

D-Hidantoinase de *Vigna angularis* foi a primeira enzima dita como um bom catalisador na síntese de D-aminoácidos por Morin (1993). A D-hidantoinase de *Bacillus* sp. AR9, na forma nativa é um tetrâmero com massa molecular de 210 kDa (KISHAN et al, 2005). Fan e Lee (2001) extraíram hidantoinase de *Aduzi bean* e a massa molecular de uma subunidade da enzima purificada foi determinada em 52,5 kDa. Sieman et al (1999) extraíram a D-hidantoinase específica de *Arthrobacter crystallopoites* DSM 20117 e esta era um tetrâmero de 257 kDa, com todas suas subunidades idênticas.

Esta enzima foi imobilizada em diferentes suportes, tais como, Eupergit C, Eupergit C 250, EAH Sepharose (RAGNITZS et al, 2001) e resinas de troca iônica de poliestireno (JIA et al, 2006). Aranaz et al (2003), co-imobilizaram D-hidantoinase de *Agrobacterium radiobacter* em quitina. Chern e Chao (2005) produziram uma proteína híbrida de D-hidantoinase, expressa em *E-coli*, e a imobilizaram por adsorção em pérolas de quitina.

2.4 Imobilização e Estabilização de Enzimas

As enzimas por atuarem sob condições suaves, ter estrutura complexa e geralmente frágil sob condições extremas de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos, podem inativar-se, ou seja, perderam a sua capacidade de catalisar reações (TARDIOLI, 2003). Enzimas estabilizadas termicamente apresentam uma série de vantagens, pois a altas temperaturas a conversão é maior, a contaminação do meio pela ação microbiana e a viscosidade são menores e a solubilidade de substratos é maior.

Devido às vantagens que o uso de enzimas promove no mercado mundial, o uso desses catalisadores está em plena expansão. As desvantagens na utilização de enzimas em sua forma livre são a sua impossibilidade de reutilização, devido ao alto custo de recuperação, e a contaminação do produto desejado. O termo “enzima imobilizada” foi usado na primeira Conferência de Engenharia Enzimática, realizada em Henniker, New Hampshire, USA, em 1971 (CARDIAS, 1996).

A imobilização de enzimas é a técnica especificamente designada para restringir fortemente a liberdade de movimentos do catalisador biológico, ou seja, a enzima fica confinada em um suporte sólido para posterior reutilização, tornando o processo mais barato.

Enzimas imobilizadas e estabilizadas são atualmente muito utilizadas como biocatalisadores industriais (LOPÉZ-GALLEGO et al, 2005) em reações de biotransformações. A Imobilização e a estabilização permitem melhorar o controle operacional, ter maior flexibilidade no uso de diferentes configurações do reator, além de possibilitarem a fácil recuperação do produto e a reutilização dos biocatalisadores (MATEO et al, 2002). Guisán (1988) desenvolveu estratégias de imobilização e estabilização de enzimas em suportes pré-existentes. A idéia de reuso significa que a estabilidade final da enzima deve ser alta o suficiente para permiti-lo. A enzima, para isto, precisa já ser bastante estável na forma livre e continuar ou tornar-se altamente estável durante o processo de imobilização (MATEO et al, 2007).

Algumas desvantagens associadas à imobilização de enzimas podem ser decorrentes de possíveis alterações da conformação nativa da enzima, alto custo de alguns suportes e perda de atividade durante o processo de imobilização. Muitas enzimas têm sido imobilizadas e estabilizadas pelo uso de diferentes técnicas de imobilização, tais como, tripsina, enzima usada para a transformação de insulina suína em insulina humana (BLANCO et al, 1989), penicilina G acilase de *E. coli*, usada na hidrólise de penicilina G

para a produção do 6-APA, importante na síntese de antibióticos (ÁLVARO et al, 1990), dentre outras.

Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras. A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do processo de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. A morfologia interna dos suportes é a chave para uma imobilização bem sucedida, pois determina as possibilidades de multi-interações enzima-suporte (MATEO et al, 2002).

As características do suporte, grupos reativos e condições de imobilização são cuidadosamente selecionados para envolver o maior número de grupos reativos na imobilização (MATEO et al, 2007). Só a imobilização de uma enzima não garante a estabilização da sua estrutura tridimensional. Diversos estudos buscam encontrar estratégias de proteção da estrutura tridimensional, como por exemplo, a ligação covalente multipontual, que pode promover um efeito significativo na estabilização da molécula, por conferir maior rigidez à estrutura nativa da enzima (BLANCO e QUISÁN, 1989; PALOMO et al, 2003). As propriedades das enzimas imobilizadas são determinadas pelas características da enzima e do suporte utilizados. A interação entre os dois resulta em um biocatalisador com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas particulares ao sistema enzima-suporte empregado (GONÇALVES, 2001).

Existem enzimas de interesse industrial que são proteínas multiméricas (enzimas com mais de uma subunidade). Estas apresentam dificuldades adicionais para serem estabilizadas, devido à complexidade de sua estrutura e as características específicas do seu mecanismo de desativação. A estabilização desta classe de enzimas requer a aplicação de novas estratégias dirigidas para evitar a dissociação das subunidades que formam a proteína (CARDIAS, 2000).

2.5 Métodos de Imobilização

A ligação das enzimas a um suporte sólido pode ser por adsorção, ligação química ou encapsulação. As enzimas ligadas por ligação química podem ser posteriormente subdivididas de acordo com o tipo de interação entre a enzima e o suporte ou entre as próprias moléculas de enzimas. A imobilização enzimática pode ser dividida em irreversíveis e reversíveis.

2.5.1 Adsorção Física

Adsorção física é um método mais simples e consiste na interação física não-específica da enzima com a superfície do suporte por agitação de uma solução concentrada de enzima. O suporte a ser utilizado passa por uma etapa de ativação bastante simples para um maior rendimento de imobilização. A enzima é estabilizada por interações fracas com o suporte como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas (ARROYO, 1998).

As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, efeitos difusionais são desprezíveis e a estrutura conformacional da enzima sofre pouca ou nenhuma alteração. As grandes desvantagens são a adsorção não-específica de outras proteínas e substâncias como substrato e a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH, força iônica e a presença de substrato (ARROYO, 1998).

2.5.2 Encapsulação

Este método de imobilização consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados (poliacrilamida, colágeno, alginato entre outros) (ARROYO, 1998).

A enzima se encontra confinada preferencialmente no interior da matriz. Este método de imobilização requer baixa concentração de enzima para a obtenção de derivados com elevada atividade. Conseqüentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzimas imobilizadas (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores somente podem ser aplicados com substratos de baixo peso molecular; a possível inativação da enzima e os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa.

2.5.3 Ligação Covalente

Imobilização de enzimas por ligação covalente é o método mais interessante para a indústria (ARROYO, 1998). Este método de imobilização baseia na ativação do suporte

com grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é simples como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Dentre os 20 aminoácidos encontrados na estrutura protéica da enzima, os mais reativos para a formação da ligação covalente com o suporte são lisina, cisteína, tirosina e histidina (TAYLOR, 1991).

A principal vantagem deste método é a grande força de ligação, com conseqüente estabilidade do complexo enzima-suporte. Pode-se obter alta atividade após imobilização e, além disso, possíveis alterações da conformação tridimensional da molécula de enzima ligada ao suporte podem ser favoráveis (alteração do pH e da temperatura ótima, por exemplo), embora seja um método mais complexo que os anteriores e, normalmente, de maior custo.

Para a imobilização são usados os grupos aminos, presentes na enzima (MATEO et al, 2005). Estes, quando desprotonados, são muito reativos atuando como átomos com carga positiva localizados na superfície da enzima. Guisán (1988) apontou as razões para escolher os grupos aminos dos resíduos de lisina da enzima e o grupo NH_2 terminal para a imobilização multipontual em suportes ativados. Primeiro, porque a maioria das enzimas apresenta muitos resíduos de lisina que geralmente não estão envolvidos no centro catalítico. Segundo, porque os grupos amino são polares e estão geralmente expostos ao meio na superfície da enzima.

Uma característica deste sistema de imobilização é que a reação enzima-suporte é muito rápida e facilmente hidrolisável. A ligação unipontual enzima-suporte é reversível, mas a imobilização torna-se irreversível quando ocorre através de dois ou mais pontos de ligação (GUISÁN, 1988).

Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da estrutura tridimensional da molécula de enzima, ou seja, a união da enzima ao suporte por vários pontos pode conferir alta rigidez à molécula como representado na Figura 2.7, e, por conseguinte, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos, entre outros (MATEO et al, 2007).

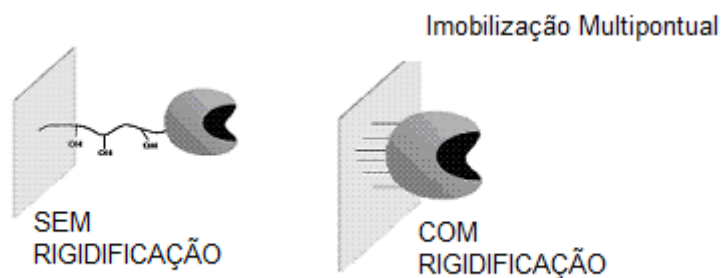


Figura 2.7. Efeito da imobilização na estabilidade da enzima (MATEO et al, 2007).

Geralmente, a união covalente multipontual é suficiente para obter a estabilização de enzimas de estrutura simples. Existem, entretanto, muitos outros casos onde as enzimas de interesse são proteínas multiméricas que apresentam dificuldades adicionais para serem estabilizadas devido à complexidade de sua estrutura e às características específicas de seu mecanismo de desativação (CARDIAS, 2000). A estabilização deste tipo de enzimas requer a aplicação de novas estratégias para evitar a dissociação das subunidades que formam a proteína, ou seja, requer modificações pós-imobilização. Isso porque geralmente uma a duas subunidades se liga covalentemente ao suporte, podendo ocorrer perda de atividade por dissociação das outras subunidades. Assim, é aconselhável entrecruzamento das subunidades. O entrecruzamento com dextrano-aldeído é um exemplo de técnica que pode ser utilizada para este fim. Assim, após a imobilização, esses polialdeídos são adicionados à solução de imobilização, os quais promovem o entrecruzamento das subunidades através dos grupos amino da enzima (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al, 1999).

2.6 Suportes para Imobilização de Enzimas

A escolha do material, forma e entre outras características do suporte a ser usado para imobilizar enzimas é determinante para o sucesso ou fracasso do conjunto enzima-suporte-método de imobilização.

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo e outras. Eles podem ser classificados pela composição como: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados) e também por sua morfologia como: materiais porosos, não-

porosos e de estrutura de gel (CARDIAS, 1996 *apud* MESSING, 1975). Embora os suportes inorgânicos tenham muitas vantagens sobre os orgânicos (alta resistência, estabilidade térmica, fácil regenerabilidade e resistência ao ataque microbiano e de solventes orgânicos) muitas enzimas imobilizadas comercialmente disponíveis são obtidas com suportes orgânicos, devido a sua alta reatividade (TARDIOLI, 2003).

A morfologia do poro é fundamental, pois, os materiais porosos têm grande área superficial interna disponível e é nesse ambiente que a enzima fica protegida permitindo o livre acesso do substrato. Os materiais não-porosos apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras (CARDIAS, 2000).

Os polímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) e sintéticos (nylon e poliestireno) são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente. Dentre os suportes orgânicos naturais, agarose e quitosana têm sido extensamente utilizados como matrizes para a insolubilização de enzimas (GUISÁN, 1988; BLANCO et al, 1989; LÓPEZ-GALLEGO et al, 2005; TARDIOLI et al, 2003a,b; MENDES et al, 2006; ALTUN e CETINUS, 2007; ADRIANO et al, 2008; RODRIGUES et al, 2008).

2.6.1 Quitosana

Quitosana é um polímero derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, depois da celulose, obtida exclusivamente de exoesqueletos de crustáceos como, por exemplo, de caranguejo e camarão (ADRIANO, 2008).

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (KRAJEWSKA, 2004; GEORGE e ABRAHAM, 2006). Sua estrutura é formada pela repetição da unidade β (1,4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose e apresenta uma cadeia polimérica quimicamente similar à da celulose. Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino na estrutura da quitosana. A Figura 2.8 apresenta as estruturas primárias da celulose, quitina e quitosana.

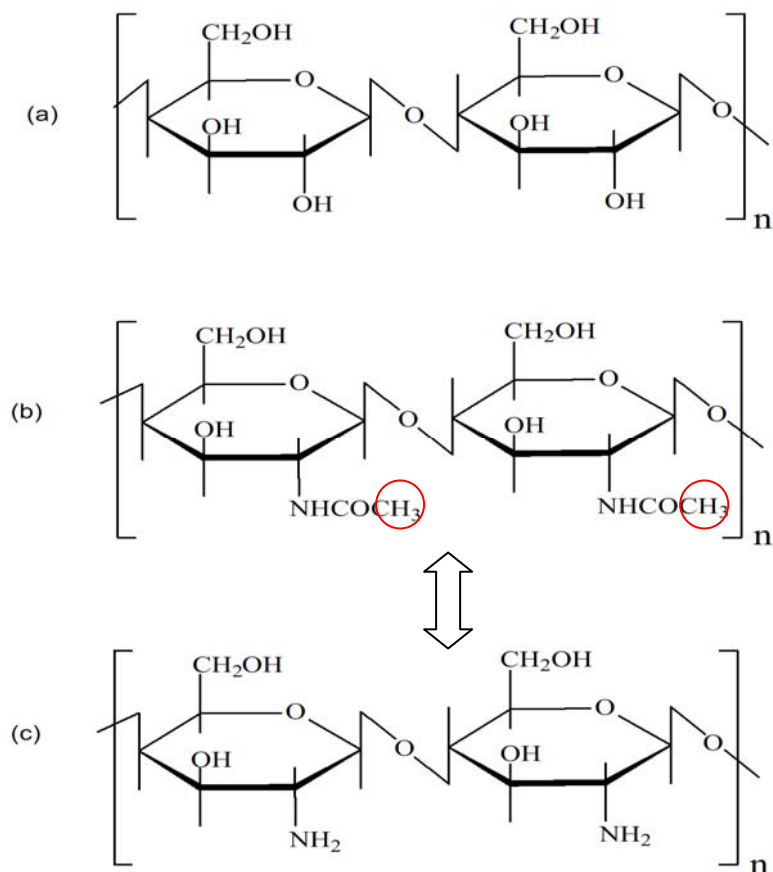


Figura 2.8. Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana (ADRIANO, 2008).

Devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%), a quitosana é um potente agente geleificante, propriedade que é responsável por muitas aplicações desta em diversos setores de síntese e produção industrial, ou seja, suas propriedades atóxicas e sua fácil formação de géis são de grande interesse industrial (BERGER et al., 2004).

Atualmente suas maiores aplicações estão centralizadas na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos (KUMAR, 2000; KRAJEWSKA, 2004). Também tem sido utilizada para obtenção de produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação controlada de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos (KUMAR, 2000; KRAJEWSKA, 2004; ALTUN e CETINUS, 2007). Na área médica vem sendo utilizada em diversas aplicações como biomaterial. A quitosana vem sendo utilizada como suporte de liberação controlada de diversos fármacos como diclofenaco de sódio, comercialmente conhecido como Cataflan (GONÇALVES et al, 2005). Outra aplicação

que vem se destacando é o uso deste como suporte para imobilização de enzimas. Este polímero é interessante devido ao alto conteúdo de grupos amino primário, que permitem a quitosana ser homogeneamente modificada em meio aquoso, enquanto a nucleofilidade destes grupos permitem modificações químicas na molécula visando um melhor desempenho funcional (KUMAR et al, 1999; CHIOU e WU, 2004). Algumas aplicações da quitosana, nas diferentes áreas, estão apresentadas na Tabela 2.2. (www.darmathouth.edu).

Tabela 2.2. Aplicações da quitosana em diferentes áreas

Aplicações da Quitosana	
	Remoção de íons metálicos
Tratamentos de Efluentes	Floculante e Coagulantes de: Proteínas e Pigmentos
	Remoção de sólidos suspensos
Indústria de Alimentos	Agente conservante
	Estabilização de cores
	Aditivo de alimento animal
	Controle de taxa de colesterol sanguíneo
Medicina	Controle de liberação de fármacos
	Queimadura de pele
	Lentes de contato
	Imobilização de enzimas
Biotecnologia	Separação de proteínas
	Recuperação e imobilização de células
	Cromatografia
Agricultura	Cobertura de sementes
	Fertilizantes
	Controle de liberação de agroquímicos
Cosméticos	Condicionador
	Creme de face e mãos
	Loção de Banho
Papel e Papelão	Tratamento de superfície
Membranas	Controle de permeabilidade
	Osiose reversa

Devido à sua baixa estabilidade em pH ácido, diversas alternativas têm sido propostas para aumentar sua estabilidade como reticulação com agentes bifuncionais para a formação de géis mais resistentes ou a aplicação de outros biopolímeros como

carragenina, gelatina e alginato (ADRIANO et al, 2008). Estas técnicas têm sido utilizadas para diversas aplicações como liberação controlada de fármacos e como suporte para a imobilização de enzimas (BERGER et al, 2004; MENDES et al, 2006; ADRIANO et al, 2008).

O complexo quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana (TAPIA et al, 2004). Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons (GEORGE e ABRAHAM, 2006). A elevada solubilidade da quitosana é minimizada na presença de alginato, pois este biopolímero é insolúvel em pH ácido e em pH alcalino é facilmente solubilizado, o que não é observado para a quitosana. Deste modo, o complexo quitosana-alginato pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

2.6.2 Agarose

Agarose é um polissacarídeo extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas da classe *Rodophyta*. Ocorre como carboidrato estrutural na parede das células. É um polímero composto de subunidades de galactose, como mostrado na Figura 2.9 (TARDIOLLI, 2003 *apud* KENNEDY, 1987).

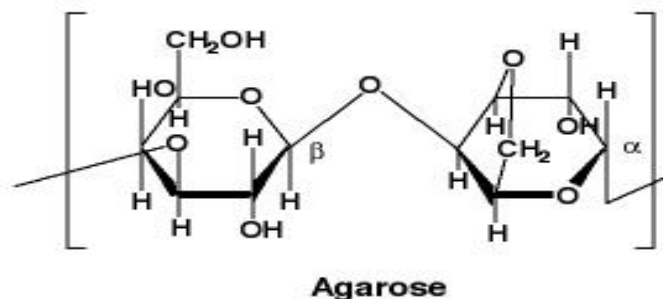


Figura 2.9. Estrutura química da agarose.

A agarose constitui uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto com maior capacidade de gelificação e com as seguintes propriedades: (i) pouca quantidade de grupos eletronegativos, bastante inerte e adequado para técnicas cromatográficas; (ii) fácil dissolução aquosa; (iii) excelente transparência óptica tanto nas regiões de espectro visível quanto na região do ultravioleta, que permite uma melhor quantificação por técnicas espectrofotométricas; (iv) estrutura macroporosa, na qual é possível variar o tamanho dos poros (Figura 2.10); (v) fácil ativação e derivatização do suporte e (vi) ausência de toxicidade. A baixa resistência a altas temperaturas pode ser

superada pelo entrecruzamento entre as moléculas do polímero com epícloridrina. Altos graus de entrecruzamento implicam maior resistência mecânica e redução do tamanho dos poros. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas. Diversas publicações relatadas na literatura mostram a aplicação deste suporte para a imobilização multipontual de enzimas de diversas procedências (TARDIOLI et al, 2003).

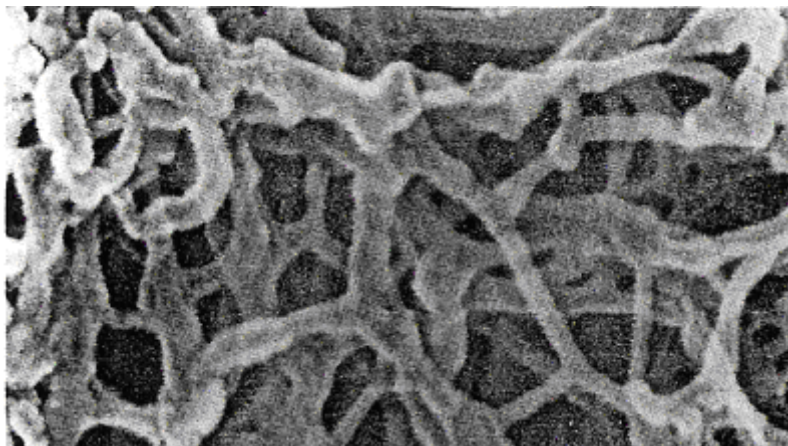


Figura 2.10. Estrutura dos macrosoros da Agarose (www.bioscience.beads.com).

2.7 Métodos de ativação de suportes

Os métodos de ativação introduzem grupos reativos na superfície do suporte capazes de reagirem com os grupos reativos da enzima. As ativações mais usadas são com reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos. Suportes ativados com grupos epóxidos possuem baixa reatividade (mesmo podendo reagir com vários grupos reativos da enzima), requerendo longos tempos de imobilização, grande excesso de enzima e condições drásticas de reação para favorecer o acoplamento enzima-suporte, como por exemplo, alta força iônica. Suportes epóxidos podem ter sua reatividade melhorada por modificação parcial dos grupos epóxidos com etilenodiamina, por exemplo. Os grupos epóxidos modificados favorecem a adsorção prévia da enzima, que depois irá reagir covalentemente com os grupos epóxidos não modificados do suporte (MATEO et al, 2000).

Variáveis como pH e temperatura podem interferir a reação dos agentes de ativação com o suporte. Como a reatividade dos grupos epóxidos do suporte com proteínas solúveis é muito baixa, estes processos de imobilização devem ocorrer mediante um mecanismo

composto por duas etapas: uma primeira onde a enzima seria adsorvida hidrofobicamente (ou ionicamente) sobre a superfície do suporte e uma segunda etapa onde se promoveria a reação covalente entre os grupos reativos da proteína e o suporte.

A ativação com glutaraldeído forma grupos aldeídos no suporte ativado que irão reagir com grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes reativas (bases de Schiff) que podem ser facilmente hidrolisadas. Embora seja o método de ativação mais utilizado em imobilizações de enzimas, ele apresenta alguns problemas, tais como: moléculas de enzima podem ser imobilizadas neste tipo de suporte com diferentes orientações, tornando o sítio ativo de algumas delas inacessível para grandes substratos (TARDIOLI, 2003); podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas das moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (BETANCOR et al, 2006); produzem derivados que são poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel; e a alta reatividade e instabilidade dos grupos reativos requerem rápido contato com a enzima.

A ativação do suporte com grupos aldeídos, usando glicidol (2,3-epoxi-propanol) como reagente bifuncional, vem sendo amplamente usado desde 1987. Este método de ativação gera aldeídos alifáticos lineares altamente estáveis, permitindo que o suporte ativado seja estocado por tempo prolongado (1 ano a 4°C), e reaja, em pH alcalino, com grupos aminos desprotonados dos resíduos de lisinas da molécula de enzima, possibilitando a formação de várias ligações covalentes enzima-suporte. Os grupos aldeídos ativos (glicoxil) por estarem moderadamente afastados da superfície do suporte (braço espaçador curto), tornam a molécula de enzima imobilizada muito mais rígida e, por conseguinte, muito mais resistente à inativação induzida por altas temperaturas, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (GUISÁN, 1988).

Na figura 2.11, observa-se a ativação dos suportes pelos agentes ativantes e em sua superfície os grupos reativos utilizados na interação com a enzima para promover o processo de imobilização.

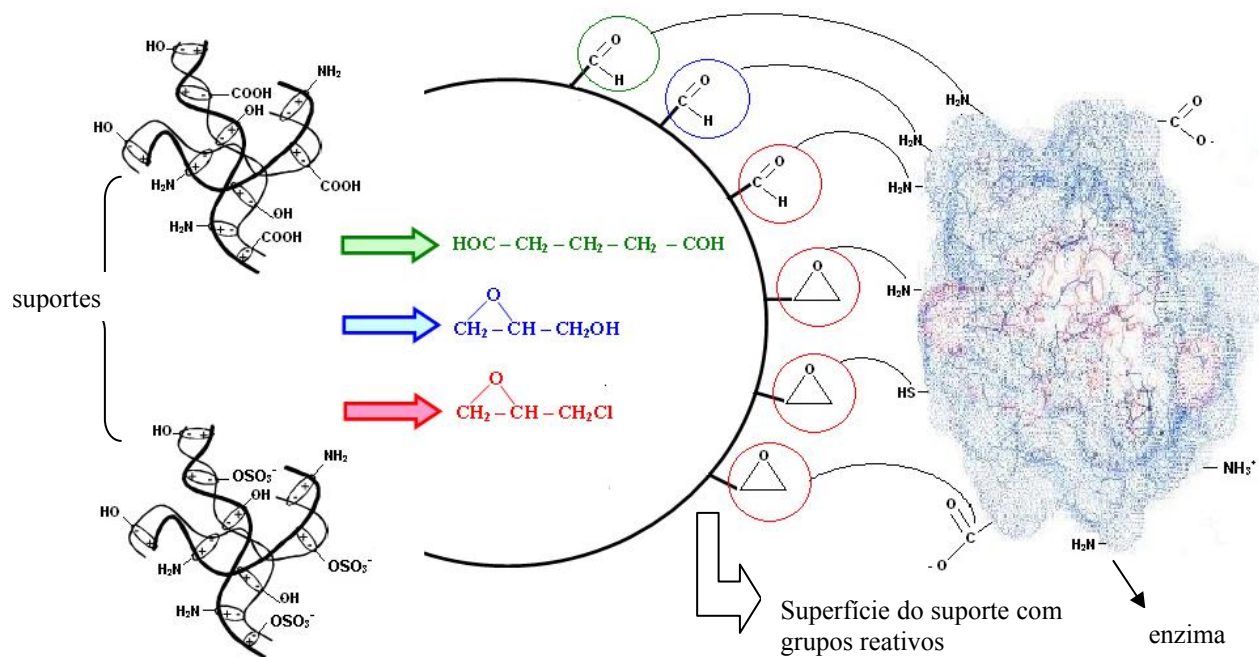


Figura 2.11 Representação dos métodos de ativação. À esquerda estão os suportes, nas cores verde (glutaraldeído), azul (glicidol) e vermelho (epicloridrina) os agentes ativantes e na superfície do suporte os grupos reativos que irão reagir com os grupos amino da enzima (ADRIANO et al, 2008).

2.8 Imobilização Multipontual de Enzimas em gel de Agarose

A ligação de uma molécula de enzima a um suporte sólido por meio de ligações químicas fortes torna a estrutura terciária da molécula mais rígida e, portanto mais estável. Essa estabilização pode ser obtida pelo método de imobilização em suportes sólidos pré-existentes.

A imobilização covalente multipontual em glicol-suporte consiste na formação de várias ligações covalentes entre grupos aminos desprotonados de resíduos de lisina de uma molécula de enzima e grupos aldeídos alifáticos lineares moderadamente afastados da superfície do suporte (grupos glicol), como mostrado na Figura 2.12.

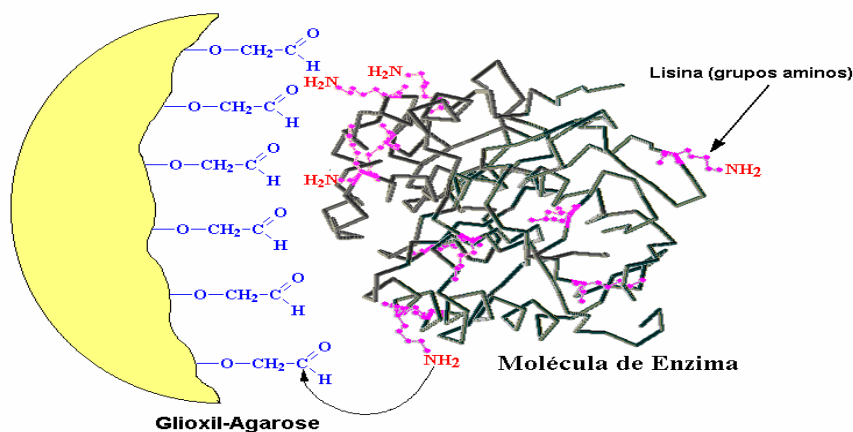


Figura 2.12. Sistema de imobilização proposto por GUISÁN (1988).

Segundo Guisán (1988), a utilização de géis glioxil-agarose possibilita uma intensa multi-interação enzima-suporte (mesmo sendo as superfícies da enzima e do suporte não complementares), sem distorção da estrutura da enzima e com pequena perda na atividade da enzima imobilizada devido à ausência de impedimentos estéricos para a reação química amino-aldeído (bases reativas de Schiff -CH = N-), produzindo-se assim derivados com alta retenção de atividade, alta rigidez e, por conseguinte, alta estabilidade térmica.

As bases de Schiff (Figura 2.13), sempre que formadas, devem ser reduzidas com borohidreto de sódio- agente redutor- para a formação de amins secundárias estáveis e também os grupos aldeídos remanescentes dos suportes são convertidos em grupos hidroxilas inertes, formando assim um suporte inerte.

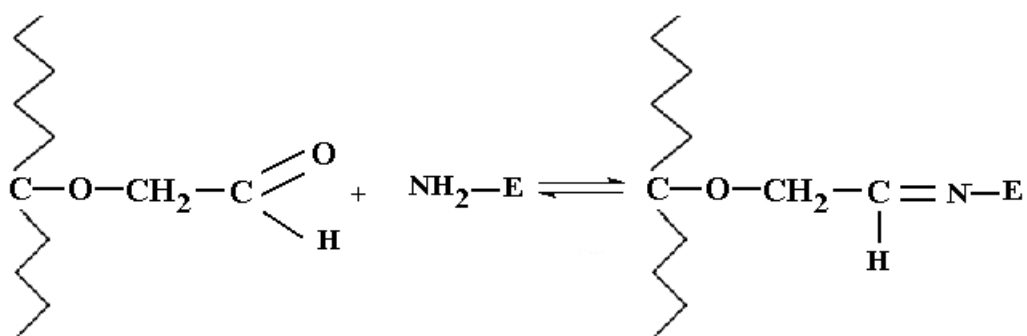


Figura 2.13 Reação enzima (amino)-suporte (aldeído) - Formação da Base de Schiff (TARDIOLLI, 2003).

Por exemplo, trabalhos de TARDIOLI et al, (2003 a, b) mostraram que derivados de carboxipeptidase A (uma metalo exoprotease) e Alcalase (preparação comercial de subtilisina) foram respectivamente 213 e 515 vezes mais estáveis que as enzimas na forma solúvel. A Tabela 2.3 mostra a atividade recuperada e o fator de estabilidade de diversas

enzimas imobilizadas em gel glioxil-agarose (MATEO et al, 2005). A atividade recuperada variou de 60 a 100% e a estabilização, de acordo com o tempo de meia vida do biocatalisador, em muitos casos, foi 1000 a 100000 vezes mais estável que a enzima imobilizada unipontualmente.

Glioxil-Agarose apresenta propriedades que favorecem uma intensa ligação covalente multipontual das proteínas, como: alta reatividade dos grupos glioxil com grupos amino não ionizáveis; boa congruência geométrica entre proteína e o suporte; bom controle da ativação; alta estabilidade dos grupos glioxil, possibilidade de longa multi-interação entre enzima e suporte e longo tempo de armazenamento (MATEO et al, 2006).

Tabela 2.3. Atividade recuperada e fator de estabilidade para diversas enzimas imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose.

Enzima	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
Tripsina	75	10000 ^a
Quimotripsina	70	60000 ^a
Penicilina G acilase (<i>E. coli</i>)	70	8000 ^a
Penicilina G acilase (<i>K. citrophila</i>)	70	7000 ^a
Ferredoxina NADP redutase (<i>Anabaema</i> sp.)	60	1000 ^a
Lipase (<i>C. rugosa</i>)	50	150 ^a
Lipase (<i>B. thermocatenuatus</i>)	75	500 ^a
Esterase (<i>B. stearothermophilus</i>)	70	1000 ^a
Termolisina (<i>B. thermoproteolyticus</i>)	100	100 ^a
Glutamato racemase	70	1000 ^a
Alcalase	54	500
Uroquinase	80	10

a: comparada com enzimas imobilizadas unipontualmente.

Fonte: MATEO et al, (2006).

2.9 Variáveis no Processo de Imobilização de Enzimas por Ligação Covalente Multipontual

2.9.1 Efeito do Grau de Ativação do Suporte

Um parâmetro bastante relevante à possibilidade de interação multipontual enzima-suporte é o grau de ativação do suporte, ou seja, a densidade de grupos reativos (aldeído) na superfície do suporte. A densidade de grupos aldeídos na superfície do suporte irá determinar as possibilidades de alinhamentos corretos entre os grupos amino da enzima e os grupos aldeídos do suporte. Então, quanto maior a densidade de grupos aldeídos maior a possibilidade de formação de novas ligações amino-aldeídos (TARDIOLI, 2003).

Em termos de número de grupos aldeídos por unidade de massa ou volume de suporte, dependem da porcentagem de agarose usada na preparação dos géis (MATEO et al, 2005). Elevada porcentagem de agarose presente nos géis é responsável pela formação

de suporte com elevada porosidade, pois o número de entrelaçados entre as fibras é maior, sendo mais favorável para uma efetiva imobilização de enzimas pela técnica multipontual.

A maior porcentagem de agarose implica também em diâmetro de poros menores, o que pode ser um problema para substratos macromoleculares. Além disso, a estabilidade da enzima imobilizada aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de agarose. Para agarose 10%, o fator de estabilidade é 10 vezes superior ao da agarose 4%, dependendo do tamanho da enzima utilizada. A razão é a geometria da enzima, pois quanto maior é o tamanho da enzima, maior será o contato com os grupos reativos do suporte e assim a multi-interação do sistema enzima-suporte é mais efetiva conferindo maior número de ligações e a mobilidade da enzima é mais restrita, reduzindo a inativação (MATEO et al, 2005).

O controle da ativação do suporte permite controlar a intensidade das reações da enzima com o suporte e é possível também reduzir o grau de ativação para níveis desejados, pois elevada ativação pode acarretar distorção da enzima na imobilização. Se a concentração de grupos glioxil é baixa, o rendimento de imobilização também é baixo e o período de contato da enzima com o suporte deve ser prolongado para a obtenção de derivados imobilizados mais estáveis, pois se o tempo de imobilização for pequeno, a estabilidade obtida para o derivado terá um comportamento similar à enzima solúvel.

2.9.2 Efeito das Condições de Reação

2.9.2.1 Temperatura

Sabe-se que quanto maior a temperatura maior a velocidade da reação, pois o aumento de temperatura provoca um aumento nos movimentos vibracionais da molécula de proteína, tornando-a mais flexível e assim possibilitando alinhamentos corretos enzima-suporte. Assim, o número de base de Schiff formadas entre grupos aldeído no suporte e amino na enzima será maior a altas temperaturas. Contudo, como a multiinteração requer no mínimo três horas de tempo de imobilização, para evitar a inativação da enzima é usual se utilizar no máximo temperatura ambiente (25°C) (BLANCO et al, 1989).

2.9.2.2 pH

A estrutura tridimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, depende de interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre grupos funcionais da enzima, que são afetadas pelo pH. Assim, alterações nessas interações podem afetar o sítio ativo, diminuindo a atividade catalítica ou mesmo desnaturar a enzima. Por isso, é necessário

que se trabalhe em condições ótimas onde a atividade catalítica se conserve por um maior período de tempo (LENINGHER, 2006).

Em valores de pH abaixo de 10, apenas grupos amino terminais das enzimas se encontram desprotonados, o que diminui a possibilidade de formação de ligações multipontuais. Quanto se deseja fazer uso de grupos amino de lisinas, somente haverá concentração significativa desses na forma neutra a pH acima de 10,0, pois esses possuem pK 10,5 (BLANCO et al, 1988). Em pH acima de 10, o número de grupos desprotonados de lisina aumenta, acelerando assim a velocidade da reação e, portanto diminuindo o tempo de contato enzima-suporte.

2.9.2.3 Tempo de Imobilização

Um outro fator importante no processo de imobilização multipontual é o tempo de contato da enzima com o suporte. Imobilização em pH alcalino e com suporte altamente ativado pode ser extremamente rápido, podendo atingir curtos períodos de imobilização. Os grupos amino situados na superfície da proteína não estão alinhados com os grupos aldeídos da superfície do suporte, ou seja, a enzima e o suporte ativado não são estruturas que se completam. Quando a enzima, já imobilizada, continua a interagir com o suporte ativado, novos e corretos alinhamentos entre os grupos da enzima e os grupos aldeídos do suporte são formados e esses alinhamentos quando são produzidos, a subsequente ligação química é muito rápida e irreversível (ADRIANO, 2008).

Este mecanismo para estabilização da enzima por ligação covalente multipontual em suporte ativado está de acordo com a dependência observada da estabilização do derivado e com o tempo de imobilização. A formação de alinhamentos adicionais amino-aldeído deve ser mais lenta do que o primeiro processo de imobilização (reação da enzima solúvel com o suporte ativado), e isto, envolvem a dependência entre a estabilidade do derivado final e o tempo de contato entre a enzima já imobilizada e o suporte ativado (GUISÁN, 1987). Conclui-se, então, que a estabilidade dos derivados resultantes aumenta à medida que se aumenta o tempo de contato entre a enzima solubilizada e o suporte ativado.

2.9.2.4 Tampão

O tampão a ser empregado também é um outro fator bastante importante no processo de imobilização. É necessária a utilização de uma solução-tampão capaz de facilitar a interação dos grupos lisina da enzima com os grupos glioxil do suporte e o

tampão mais utilizado neste processo de imobilização é o tampão bicarbonato (GUISÁN, 1988). Estudos relatados na literatura mostram que a imobilização de enzimas na presença de tampão borato atingiu níveis poucos satisfatórios de fixação da enzima penicilina G acilase de *Escherichia coli* em glioxil-agarose devido à formação de complexos com os grupos aldeído (ALVARO et al, 1990).

2.9.3 Derivados de D-Hidantoinase quimicamente modificados com Dextranas

Dextranas são polímeros de glicose que estão disponíveis comercialmente numa larga faixa de massas moleculares, como apresentado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Dextranas disponíveis de Fluka (Bucks, Switzerland) e Sigma (St. Lois, MO) (acessado site www.sigmaldrich.com data 23/07/2008).

Tamanho	Fluka	Sigma	Tamanho	Fluka	Sigma
1.000	+	-	100.000-200.000	-	+
5.000	+	-	150.000	+	-
9.000-11.000	-	+	270.000	+	-
12.000	+	-	425.000-575.000	-	+
15.000-20.000	-	+	410.000	+	-
25.000	+	-	670.000	+	-
35.000-45.000	-	+	1.400.000	+	-
50.000	+	-	~ 2.000.000	-	+
60.000-90.000	-	+	5.000.000-40.000.000	-	+
64.000-76.000	-	+	~60.000	+	-
80.000	+	-	~20.0000	+	-

+: disponível comercialmente.

-: não disponível comercialmente.

Cada monômero de glicose contém dois grupos OH vicinais que podem ser facilmente oxidados com periodato, resultando em dois grupos aldeídos por molécula de glicose (YAMAGATA et al, 1994 *apud* CARDIAS, 2000). Isto permite a produção de polímeros de polialdeídos (Figura 2.14) que podem reagir com grupos aminos acessíveis localizados na superfície da proteína. A redução posterior com borohidreto de sódio forma ligações amins secundária irreversíveis entre a proteína e o polímero, e ao mesmo tempo, reduz os grupos aldeídos remanescentes presentes no polímero. Assim, após a modificação química, a enzima fica ligada a um polímero inerte e altamente hidrofílico.

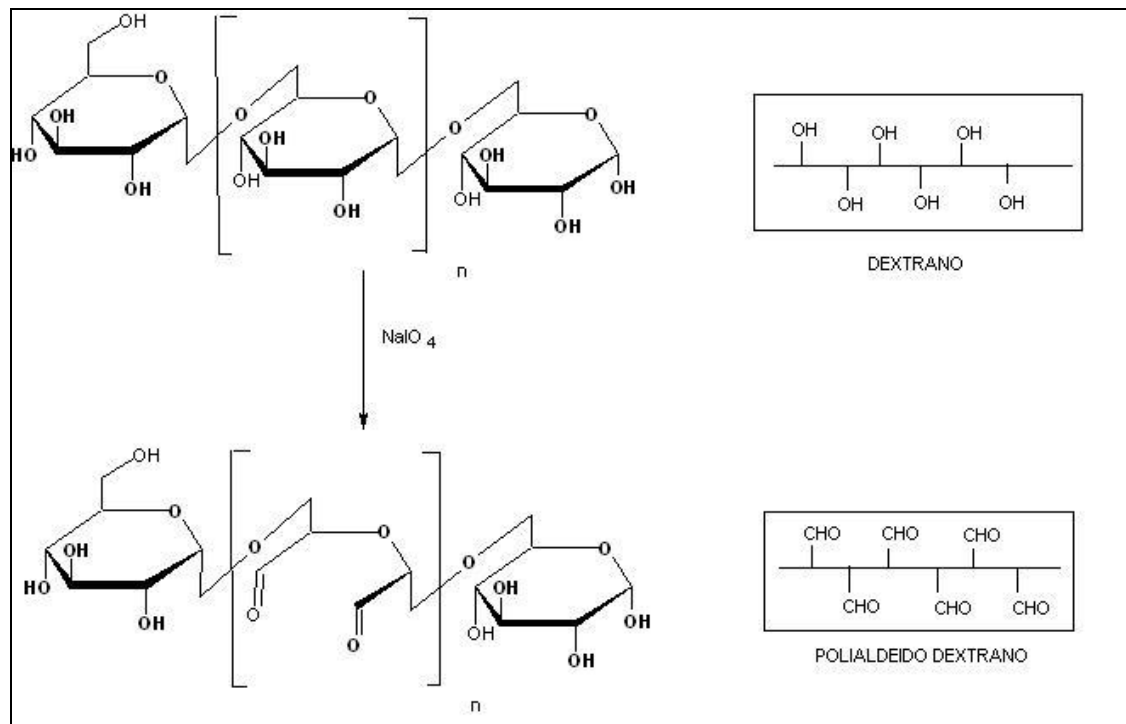


Figura 2.14 Preparação de polidextranas (CARDIAS, 2000).

A formação de uma camada hidrofílica contínua e espessa cria um ambiente hidrofílico ao redor da enzima. Isso pode aumentar a sua estabilidade contra agentes desnaturantes (KHEMELNISKY, 1991 *apud* CARDIAS, 2000). Esta camada deve ser aberta o suficiente para permitir a difusão de substratos e produtos.

Para formar essa barreira espessa e hidrofílica sem introduzir grandes modificações químicas na superfície da enzima a utilização de polímeros polifuncionais é de grande utilidade, pois uma pequena modificação química da superfície pode envolver uma grande área da proteína, gerando uma barreira espessa que “protege” a enzima da inativação térmica e da inativação devido a presença de cosolventes (MATEO et al, 2006).

2.10 Método de Separação: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatografia é um método físico-químico de separação que se baseia na migração diferencial dos compostos de uma mistura mediante as diferentes interações presentes entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio entre as duas fases imiscíveis, sendo influenciada pela composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura da separação.

A grande variedade de combinações possíveis entre fases estacionárias e fases móveis

tornou a cromatografia uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação no ramo das separações (CASS e DEGANI, 2001).

2.10.1 Cromatografia Quiral

A descoberta da tridimensionalidade das moléculas, a partir de separações dos enantiômeros de uma mistura de um sal de ácido tartárico em 1848, por Pasteur, despertou um grande interesse nos cientistas (CASS e DEGANI, 2001). Estas moléculas apresentam quiralidade, ou seja, possuem centros assimétricos (o átomo de carbono possui em cada uma de suas ligações substituintes diferentes entre si) (COELHO, 2001).

A rotineira resolução analítica de estereoisômeros foi relativamente difícil representando um desafio a Química Moderna, nos anos 80. Entretanto, por volta dos anos 90 o uso da CLAE, estabeleceu grandes avanços tecnológicos nesta área, possibilitando a análise e separação de enantiômeros (WHITE e SUBRAMANIAN, 1994; CASS e DEGANI, 2001; WARD e FARRIS, 2001).

Exemplos típicos de compostos quirais são os aminoácidos, usados como produtos e intermediários para fármacos. Todos os aminoácidos, com exceção da glicina, são substâncias quirais. Na importante classe de moléculas α -aminoácidos, ambas as formas D e L podem ser sintetizadas e separadas por processos que envolvem enzimas (MACHADO et al, 2005). Tecnologias modernas para a produção de aminoácidos são baseadas na síntese química e bioquímica (KOSTOVA e BART, 2006). Métodos por cromatografia quiral são os melhores para a separação dos enantiômeros (KACZMARSKI et al, 2002; WARD e FARRIS, 2001).

A produção por síntese estereosseletiva do enantiômero desejado, é muito cara, difícil e pouco seletiva. Devido à baixa seletividade na síntese, a extração, separação e purificação do enantiômero sintetizado são necessárias (KACZMARSKI et al, 2002).

A análise da literatura publicada, nos últimos anos, em revistas científicas de química orgânica, química farmacêutica, farmacologia e outras áreas evidenciam um crescente interesse por substâncias enantiomericamente puras. Esta tendência pode ser observada tanto no setor acadêmico como no industrial (BARREIRO et al, 1997).

Os enantiômeros podem ser separados, por CLAE, pelo método direto (CASS e DEGANI, 2001). O método direto de separação emprega o uso de fases estacionárias quirais. O mecanismo de separação de enantiômeros através do método direto em cromatografia quiral está relacionado com a formação de um complexo diastereoisomérico entre o seletor quiral e cada um dos enantiômeros. A diferença de energia entre os

complexos diastereoisoméricos formados resulta em diferentes tempos de retenção. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro. É importante que a diferença de energia entre os complexos seja significativa para que a discriminação quiral ocorra (GILBERT et al, 1987; SNYDER et al, 1997).

Durante duas décadas, o número de fases estacionárias quirais avaliadas para a resolução de enantiômeros apresentou um crescimento rápido e significativo (ANOVA e HUTTA, 2003). São preparadas a partir de pequenas moléculas ou polímeros quirais adsorvidos ou quimicamente ligados a um suporte, geralmente sílica (YASHIMA, 2001).

Diferentes tipos de seletores quirais são empregados como fases estacionárias, tais como: proteínas e enzimas, polímeros, ciclodextrinas e seus derivados, polissacarídeos e seus derivados, antibióticos macrocíclicos. A importância dessas duas últimas fases estacionárias inclui a reprodutibilidade dos resultados e larga escala de aplicações (ARMSTRONG et al, 1994; ABOUL-ENEIN e ALI, 2002).

2.10.2 Modos de eluição

- **Modo reverso de eluição**

No modo reverso de eluição, as colunas são empregadas com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, normalmente acetonitrila ou metanol. É estimado que mais de 90% dos laboratórios de análise utiliza dentro da técnica CLAE, pelo menos um método que utiliza o modo reverso de eluição (FR), ou seja, uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade. Inúmeras vantagens estão relacionadas a este tipo de eluição, como por exemplo, o uso de fases móveis de menor custo (como metanol e água), pode ser usado com fases estacionárias de diversos tipos, equilíbrio rápido quando ocorre troca de fase móvel o que facilita o emprego do modo de eluição em gradiente, rapidez nas análises e boa reprodutibilidade nos tempos de retenção (TONHI et al, 2002).

- **Modo polar orgânico**

O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, propanol, ou ainda misturas desses solventes. O uso desse tipo de fase móvel representa uma alternativa adicional para se obter a separação desejada, inclusive com possibilidade de inversão na

ordem de retenção, maior solubilidade de alguns compostos e, por serem mais facilmente removidas e reutilizadas, essas fases são bastante atrativas para separações em escalas preparativas. O comportamento da separação nesse sistema depende não apenas da fase móvel e fase estacionária, mas também da natureza dos compostos separados (CHANKVETADZE et al, 2002).

2.10.3 Parâmetros Cromatográficos

A resolução enantiomérica é muito sensível e é controlada pelos parâmetros cromatográficos que seguem (ABOUL-ENEIN e ALI, 2002).

✓ **Fator de separação (α):** é o parâmetro que mede a seletividade da separação, sendo calculado pela equação 2.1.

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (2.1)$$

Em que: k_1 e k_2 referem-se aos fatores de retenção das bandas 1 e 2.

✓ **Fator de retenção (k):** mede a distribuição da amostra no caminho cromatográfico. É calculado pela equação 2.2.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2.2)$$

Em que: t_r = tempo de retenção da banda do composto a analisar, t_0 = tempo morto da coluna, ou seja, é o tempo que um composto que não possui nenhuma afinidade pela fase estacionária leva desde sua injeção até a chegada no detector.

✓ **Resolução (R_s):** mostra a qualidade da separação baseando-se na largura da $\frac{1}{2}$ altura das bandas além de suas distâncias (Figura 2.13.), sendo calculado pela equação 2.3.

$$R_s = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (2.3)$$

Em que: t_1 e t_2 são os tempos de retenção de duas bandas adjacentes, w_1 e w_2 são as larguras das bandas medidas na meia altura da banda, em unidade de tempo.

Na figura 2.15 observa-se um cromatograma que identifica os principais pontos usados nos cálculos dos parâmetros cromatográficos.

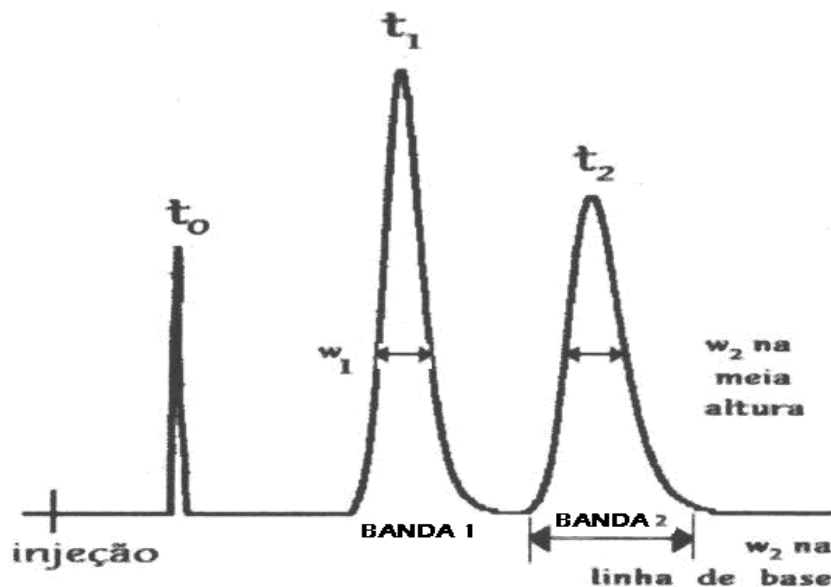


Figura 2.15. Esquema de um cromatograma com medidas relacionadas aos cálculos dos parâmetros cromatográficos (CASS e DEGANI, 2001).

2.10.4 Antibióticos Macrocíclicos

Antibióticos macrocíclicos agem como agentes de separação em cristalização, precipitação, filtração, eletroforese e cromatografia por possuírem características, tais como, centros estereogênicos e grupos funcionais que os ajudam a interagir com analitos; e servem como seletores quirais, pois permitem múltiplas interações com moléculas quirais. Essa alta capacidade de discriminação é atribuída às simultâneas interações polares e iônicas nos centros quirais e sítios de ligação localizados na cavidade da sua estrutura em forma de “cesta de basquete” (JANDERA et al, 2001). Têm massa molecular entre 600 e 2200 kDa, podem ser básicos, ácidos ou neutros e possuem pouca ou nenhuma absorvância no UV.

Poucos seletores quirais oferecem altos graus de seletividade para inúmeros compostos. O mecanismo de reconhecimento quiral das fases de antibióticos macrocíclicos glicopeptídios é similar ao das glicoproteínas, exceto que os antibióticos são estáveis de 0-100% de modificador orgânico e possuem alta capacidade de carga. A estrutura destas fases indica que as interações típicas - definidas para as fases de proteína e de polissacarídeos - estão presentes, são elas: ponte de hidrogênio, interações $\pi - \pi$, interação dipolo, inclusão, interações estéricas e ligações aniônico-catiônicas.

Uma vez que estas fases possuem peptídeos, carboidratos e outros grupos ionizáveis, a seletividade será diferente em cada um dos modos de eluição (normal, polar orgânico e

reverso), possibilitando a separação de uma grande variedade de compostos (ARMSTRONG et al, 1994; ZARZYCKI et al, 1997; JANDERA et al, 2001; ABOUL-ENEIN e ALI, 2000; ABOUL-ENEIN e ALI, 2002; XIAO et al, 2003).

Os antibióticos macrocíclicos são os mais promissores no que diz respeito à separações quirais e de fato eles tiveram impacto imediato e significativo desde a sua introdução em 1994 por Armstrong (ARMSTRONG et al, 1994; WARD e FARRIS, 2001; LLISZ et al, 2006; SZTOJKOV-IVANOV et al, 2006). Há mais de 100 destes compostos, e como outras classes de seletores quirais, eles podem ser subdivididos como representado na Figura 2.16.

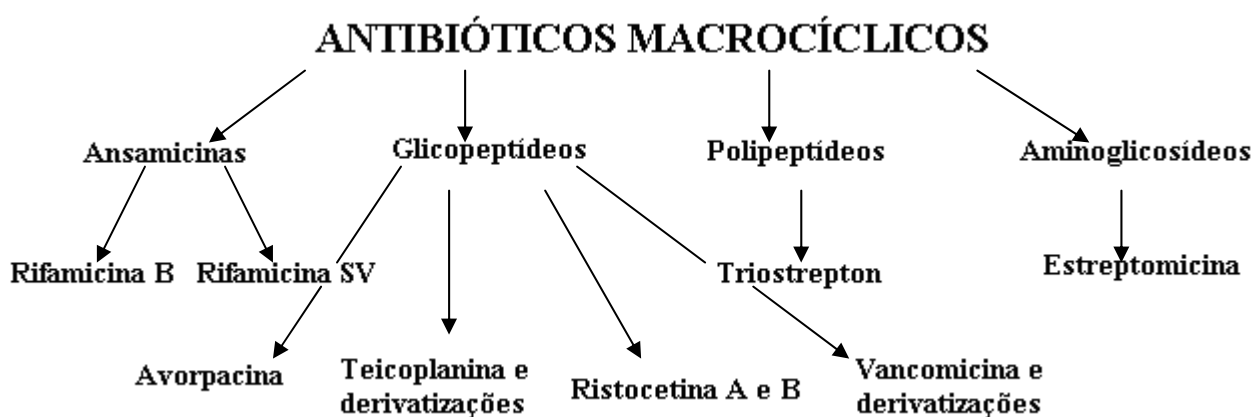


Figura 2.16. Esquema da Subdivisão dos antibióticos macrocíclicos (LLISZ et al, 2006).

Os antibióticos mais empregados como seletores quirais são: vancomicina, teicoplanina, ristocetina A e mais atualmente teicoplanina aglycon (TAG). As estruturas moleculares desses antibióticos estão representadas na Figura 2.17.

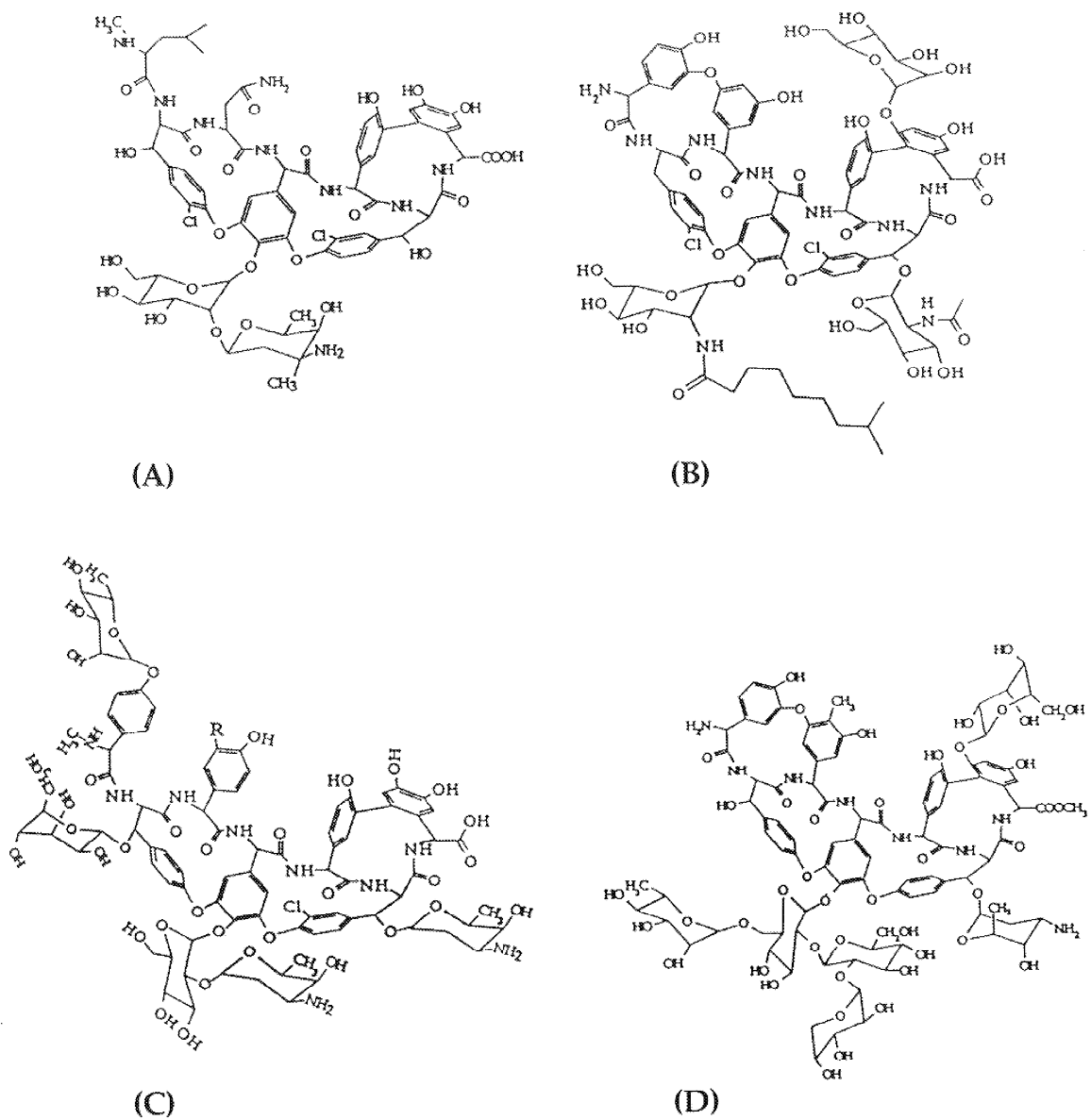


Figura 2.17. Estrutura molecular de alguns antibióticos macrocíclicos: (A) Vancomicina, (B) Teicoplanina e (C) Avorparcina e (D) Ristocetina A (WARD e FARRIS, 2001).

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A enzima usada foi a D-hidantoinase de *Vigna angularis* (EC 3.5.2.2) adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich (St Louis, MO), com atividade de 1,12 UI/mg de proteína a 30°C e pH 9,0 e 0,54 mg de proteína/mg de sólido. Os substratos usados foram hidantoína adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e a D,L-fenilhidantoína gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Octávio Augusto Ceva Antunes (Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ). Os suportes utilizados para a imobilização foram o gel de agarose 6% (Sepharose™ 6B-CL) adquirida comercialmente da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia), quitosana da Polymar S.A.(Ceára) 85% desacetilada e alginato de sódio adquirido da Vetec (SP). Agentes de ativação empregados foram glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) e epicloridrina (1-cloro-2,3-epóxido) adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e glutaraldeído 25% da Vetec (Brasil). Dextrana 40.000 de *Leuconostoc* ssp (Fluka). Os aminoácidos usados foram a D-L-Fenilglicina, L-Fenilglicina adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e D-Fenilglicina (Globe). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico. Os solventes orgânicos de grau HPLC foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45µm e posteriormente degaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

Para as análises cromatográficas utilizou-se os seguintes equipamentos: (1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba modelo LC-10 AT, um forno, modelo CTO-10AS VP, e um injetor manual RHEODYNE 7725i com alça dosadora de 100 µL. O equipamento está ligado a uma interface CBM SCL-10A VP; (2) Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AT VP, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão e um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP. Ambos os cromatógrafos estão com as bombas acopladas a um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SHIMADZU SPD-10A e os cromatogramas são registrados através de um software CLASS-VP; (3) Cromatógrafo líquido com duas bombas SHIMADZU LC 10 AD VP, onde uma delas está acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-10AL para gradiente de baixa pressão; um detector de dicroísmo LASCO modelo 2095; um auto-injetor SHIMADZU SIL 10 AD VP e uma válvula de seis caminhos VALCO NITRONIC 7000 que foi

utilizada para o sequenciamento de colunas. O equipamento está acoplado a uma interface SHIMADZU SCL 10 AVP e os cromatogramas são registrados através de um software LC Solutions. As colunas analíticas utilizadas neste trabalho foram: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm, 10 μ m, Astec), Chirobiotic TAG (250 x 4,6 mm, 10 μ m, Astec e C-18 (3,9x300 mm, 10 μ m, Waters). Comprimento de onda utilizado foi 210 nm e a vazão de 0,5 mL/min; (4) para a análise de aminoácidos o sistema de HPLC foi o modelo 717 mais detector 486 UV-Vis (Waters, Milford, MA) com uma coluna de fase reversa de 300mmx3,9mm (Pico Tag[®]; Waters) a 50°C. Foi utilizado um gradiente de duas fases móveis (A): 0,14M acetato de sódio contendo 0,5 μ M EDTA e 6% acetonitrila (pH 5,7) e (B): 60% acetonitrila. Utilizou-se uma vazão de 1,0-1,5 mL.min⁻¹ para as fases móveis: 0,0 –12,0 min, gradiente linear de A/B (99:1) a A/B (0:100); 12,0-12,5 min, eluição com A/B (99:1).

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Caracterização das propriedades bioquímicas de D-hidantoinase solúvel

3.2.1.1 Influência da temperatura

Verificou-se a influência da temperatura sobre a atividade de D-hidantoinase solúvel empregando a reação de hidrólise da hidantoína, conforme metodologia descrita no item 3.2.15, na faixa de temperatura entre 20 e 80°C.

3.2.1.2 Influência do pH

A influência do pH foi avaliada, empregando a reação de hidrólise da hidantoína a 30°C, na faixa de pH entre 3,0 a 12,0. Foram utilizados tampão acetato 50 mM na faixa de pH de 3,0 a 6,0, tampão fosfato 100mM em pH 7,0, tampão borato 100mM em 9,0 e tampão bicarbonato 100mM na faixa de pH entre 8 e 12.

3.2.2 Preparação de géis gliceril

Dez gramas dos suportes agarose 6BCL e quitosana-alginato foram lavados com água destilada em abundância e secos por sucção a vácuo. Após esta etapa, foram adicionados 3 mL de água destilada e a suspensão foi mantida sob suave agitação em banho de gelo. Foi preparada uma solução de NaOH 1,7 M (4,76 mL) e adicionada 0,1357 g de borohidreto de sódio (NaBH₄), em banho de gelo, para evitar perda do agente redutor por liberação de H₂, esta solução foi adicionada a suspensão de agarose e quitosana alginato. Em seguida, adicionou-se lentamente, 3,43 ml de glicidol em excesso, conforme metodologia descrita por Guisán (1988). A suspensão foi mantida sob agitador mecânico

em recipiente aberto por 16 h à 25°C para liberação de H₂ formado no meio reacional. O suporte foi seco por sucção a vácuo e lavado com água destilada até pH neutro. Na Figura 3.1, observa-se as reações que ocorrem para a formação dos grupos reativos no suporte.

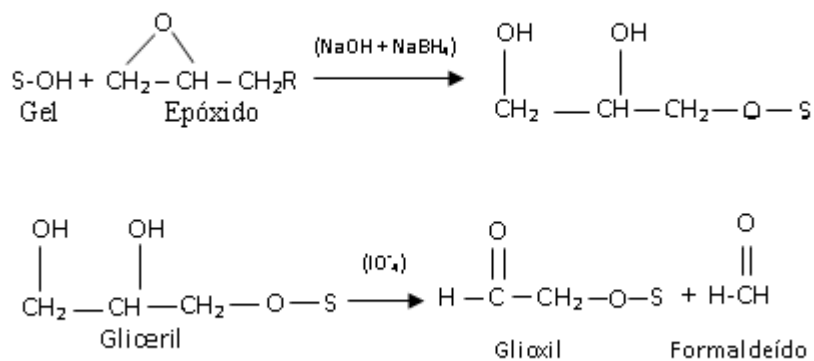


Figura 3.1 Formação de grupos reativos no suporte por glicidol.

3.2.3 Eterificação de géis

Para preparar o suporte glioxil, 3 g do gel gliceril-suporte, obtido pelo método citado acima, foi suspenso em 27 mL de água destilada (razão 1/10) e adicionado 0,0917 gramas de metaperiodato de sódio. Um μmol de NaIO_4 oxida um μmol de OH do gel, portanto, dependendo do grau de ativação desejado (quantidade de grupos aldeídos/ mL de gel gerados na superfície da agarose) a quantidade de periodato necessária foi calculada de acordo com a equação 3.1. A oxidação foi mantida sob suave agitação (em pás ou agitador rotatório) por 2 h. O suporte oxidado foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar formaldeído produzido.

$$M_{\text{NaIO}_4} (\text{g}) = \frac{(\mu\text{moles aldeído} / \text{mL de gel}) \cdot V_{\text{gel}} \cdot PM_{\text{NaIO}_4}}{1 \cdot 10^6} \quad (3.1)$$

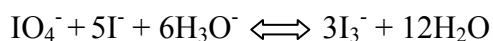
Em que: M_{NaIO_4} é a massa de periodato de sódio utilizada (g); PM_{NaIO_4} é a massa molecular do periodato de sódio (g/mol); V_{gel} é o volume de gel utilizado (mL) e a relação $\mu\text{moles aldeído/mL de gel}$ é a concentração de grupos aldeído presentes por unidade de volume de gel.

3.2.4 Preparação do gel glutaraldeído-agarose

Inicialmente, 12 mL de solução de etilenodiamina (EDA) 2 M a pH 10,0 foram adicionados a 3 g do gel glioxil-agarose ativado. Este sistema foi agitado por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado ao gel amino-agarose aproximadamente 0,171g de NaBH₄. O sistema foi mantido por mais 2 h sob agitação branda (Shaker) e em frasco aberto à temperatura ambiente. Após este período, o gel foi lavado com 1 L de solução tampão acetato 100 mM (pH 4,0) em abundância para remoção do NaBH₄ residual e posteriormente lavado com 1 L de solução tampão borato 0,1 M (pH 9,0) para o restabelecimento das cargas no suporte. Para finalizar, o suporte amino-agarose foi lavado com água e seco por sucção a vácuo. Foram adicionados ao gel amino-agarose obtido, uma solução formada por solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (3,36 mL) e glutaraldeído a 25% (5,04 mL). O recipiente contendo o gel foi coberto com papel alumínio e mantido sob agitação em incubadora refrigerada à temperatura ambiente por 18 h. Ao final deste tempo, o gel foi lavado com água em abundância para a remoção do glutaraldeído residual.

3.2.5 Quantificação de grupos aldeídos em glioxil-agarose

A quantificação dos grupos aldeídos presentes do gel de agarose ativado foi feita medindo-se o periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. Nesta reação, o periodato não consumido (IO₄⁻) reage com o iodeto (I⁻) em excesso, gerando o íon tri-iodeto (I₃⁻), que é quantificado por colorimetria.



Experimentalmente, preparou-se uma solução aquosa de periodato, nas mesmas condições de suspensão do gel gliceril-agarose (substituindo o gel por água) e uma mistura 1:1 de iodeto de potássio 10% e bicarbonato de sódio saturado. A uma cubeta de vidro, adicionou-se 3 mL da mistura 1:1 de iodeto de potássio 10% e bicarbonato de sódio saturado. A uma cubeta de vidro, adicionaram-se 3 mL da mistura 1:1 e 100 µL da solução de periodato. A seguir, procurou-se um comprimento de onda que apresentasse como resposta uma absorvância de 0,8; este valor representava o branco, portanto 100%. Durante a oxidação do gel, alíquotas foram retiradas do sobrenadante em tempos determinados (zero-imediatamente após a adição do periodato à suspensão; 30 minutos; 1 h; 1,5 h e 2h de reação), para se mensurar o consumo de periodato ao longo deste período. A equação 3.2. a seguir foi utilizada:

$$\frac{\mu\text{mol} (IO_4^-)_{\text{consumidos}}}{\text{mL de Gel}} = \frac{\mu\text{mol} (IO_4^-)_{\text{totais}} - (12,8 * ABS_{440\text{nm}} * V_{\text{suspensão}})}{V_{\text{gel}}} \quad (3.2)$$

Em que o valor 12,8 representa a razão da concentração/absorbância.

3.2.6 Imobilização de D-hidantoinase em gel glioxil-agarose e em glutaraldeído-agarose

A imobilização da D-Hidantoinase foi realizada empregando carregamento de proteína de 2,50 mg/g de gel em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na razão $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$ de 1/10, na presença ou ausência de ácido hidantóico. A imobilização foi realizada sob agitação moderada a 25°C com diferentes tempos de contato enzima-suporte. Amostras do sobrenadante e da suspensão total foram coletadas com auxílio de um filtro de ponteira para a medida de atividade enzimática e proteína. Ao final, foi adicionado à suspensão (derivado-tampão) 1 mg de NaBH_4 por mL contendo ou não íons bivalentes numa concentração de 10mM, tais como Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} . Após a etapa de redução, o gel foi lavado com água Milli-Q em abundância para a remoção de enzima residual e seco por sucção a vácuo.

3.2.7 Preparação de géis de quitosana-alginato

O gel híbrido de quitosana (2,5% m/v)-alginato (2,5% m/v) foi produzido dissolvendo-se quitosana em pó em solução de ácido acético 5% (v/v) e a esta solução foi adicionado alginato de sódio. A solução resultante foi mantida sob agitação mecânica por 30 min a temperatura ambiente. Após esta etapa, a mistura foi adicionada a uma solução de NaOH 0,1 M na razão 1:10 (v/v) para a formação dos géis, mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por 4 h. O gel foi filtrado e lavado exaustivamente com água destilada para a remoção de sais e, posteriormente, neutralizados, filtrado a vácuo e estocados sob refrigeração para posterior aplicação (ADRIANO, 2008).

3.2.8 Quantificação de grupos aldeídos em glioxil-quitosana-alginato

Aproximadamente 10 mg de suporte glioxil foram adicionados a 1mL de reagente de Schiff contendo fucsina básica 0,67% m/v, bissulfito de sódio 0,67% m/v e pH 4,5, ajustado com HCl concentrado para evitar qualquer solubilização dos suportes a base de quitosana previamente ativados com grupos amino bloqueados. Amostras eram mantidas em repouso por 24h e, posteriormente, 2mL de água destilada eram adicionados à

suspensão. Após decantação de aproximadamente 10 minutos, a absorbância do sobrenadante era lida em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de grupos aldeídos em glioxil agarose pode ser calculada através do consumo de periodato de sódio durante oxidação. Entretanto, essa metodologia para glioxil-quitosana não é precisa, pois o periodato é consumido na própria reação com a quitosana. A concentração de grupos glioxil em géis de quitosana foi obtida comparando as absorbâncias durante a reação do reagente de Schiff com aquelas obtidas pelo gel glioxil-agarose com diferentes concentrações conhecidas de aldeído por grama de gel (ADRIANO, 2008). Obteve-se uma curva de calibração da absorbância em função da concentração de aldeídos em glioxil-agarose. Deste modo, calculava-se a concentração de aldeídos em géis de quitosana com base na absorbância encontrada utilizando a curva de calibração obtida para o gel glioxil-agarose.

3.2.9 Preparação de epóxi-quitosana-alginato

Dez gramas de quitosana 2,5% (m/v) foram dissolvidos em 400mL de solução de ácido acético 5% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica. Em seguida, foram adicionados 40mL de metanol e 4mL de anidrido acético para uma acetilação parcial da quitosana. Após 1h, foram adicionados 10g de alginato de sódio 2,5% (m/v) ao sistema e mantido sob agitação por 1h. Esta solução foi adicionada em 3,6 L de solução de NaOH 0,1 M para a formação do gel e mantidos sob moderada agitação por 4h e depois lavado com água destilada. Para cada 10g de gel obtido, foram adicionados 100 mL de dimetilformamida e mantido por 30min a 60°C. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH dissolvido em 3mL de isopropanol e, ao final, 10mL de epícloridrina, conforme metodologia adaptada de Fankangwanwong et al, (2006). O sistema foi mantido sob agitação branda a 60°C por 12h. Após a epoxilação, o gel foi lavado com água destilada e Milli-Q até neutralidade (ADRIANO, 2008).

3.2.10 Determinação da quantidade de epóxidos nos suportes

A quantificação de grupos epóxidos (oxirano) foi realizada de acordo com Sundberg e Porath (1974) com pequenas modificações. A liberação de íons hidroxila foi acompanhada por neutralização com HCl 0,1M. O suporte contendo epóxidos (100mg) era adicionado a 15mL de tiosulfato de sódio 1,3M a pH 7,0 (adição de HCl) até todo consumo de epóxidos pelo tiosulfato de sódio. A quantidade de epóxidos presentes na

solução foi calculada a partir do volume de HCl adicionado para manter a neutralidade da reação (ADRIANO, 2008).

3.2.11 Imobilização de D-hidantoinase em glioxil-quitosana ativados com glicidol e epóxi-quitosona-alginato

A imobilização da D-Hidantoinase foi realizada empregando carregamento de proteína de 2,50 mg/g de gel em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na razão V_{gel}/V_{total} de 1/10, na presença ou não de ácido hidantóico. A imobilização foi realizada sob agitação moderada a 25°C com tempos de imobilização de 3 a 24 h. Amostras do sobrenadante e da suspensão total foram coletadas para a quantificação da atividade enzimática e proteína. Ao final, foi adicionado à suspensão derivado-tampão 1 mg de $NaBH_4$ por mL contendo ou não íon Mg^{2+} na concentração de 10 mM. Após a etapa de redução, o gel foi lavado com água destilada em abundância para a remoção de enzima residual e seco por sucção a vácuo.

3.2.12 Acompanhamento do processo de imobilização por meio do rendimento e atividade recuperada

A caracterização da enzima, primeiramente, deu-se pela obtenção da atividade enzimática e a massa de proteína/mg por meio de metodologias padrões de atividade enzimática (3.2.15) e método de Bradford, 1976.

Ao iniciar a imobilização, era conhecida a carga enzimática oferecida (U/g de gel e mg de proteína/g).

O rendimento de imobilização foi calculado medindo-se as concentrações de proteína, bem como atividade enzimática no branco (contendo somente tampão apropriado e enzima), na suspensão para verificar efeito de diluição devido à adição de gel e no sobrenadante ao decorrer do processo de imobilização.

A percentagem de enzima não imobilizada ($\%NI$) foi calculada dividindo-se a atividade remanescente no sobrenadante (A_{TF}) da imobilização pela atividade enzimática no branco ao final da imobilização (A_{BF}), tendo em conta a diluição devido à adição do suporte, que era determinada pela razão entre atividade no branco inicial (A_{B0}) e atividade na suspensão (A_{Susp}). Assim, conhecendo-se o número de unidades enzimáticas oferecidas por grama de gel, obtinha-se a quantidade de enzima remanescente, isto é, que não fora imobilizada de acordo com a equação 3.3.

$$\%NI = \frac{\frac{A_{B0}}{A_{Susp}} \times A_{TF}}{A_{BF}} \times 100 \quad (3.3)$$

Logo, a atividade teórica ($At_{Teórica}$) foi obtida como $(100-NI)\%$. Ao finalizar a imobilização, a atividade aparente do gel era medida (At_{Gel}) e comparada à atividade teoricamente imobilizada ($At_{Teórica}$). A atividade recuperada ($At_{Recuperada}$) foi então a razão entre atividade aparente obtida no gel pela atividade teoricamente imobilizada de acordo com a equação 3.4.

$$\%At_{Recuperada} = \frac{At_{Gel}}{At_{Teórica}} \times 100 \quad (3.4)$$

Vale ressaltar que o rendimento de imobilização também foi acompanhado pelo desaparecimento de proteína no processo através do método de Bradford.

3.2.13 Preparação dos polialdeídos pela oxidação da dextrana

Cento e vinte e cinco miligramas de dextrana (PM 40000) foram dissolvidas em 37,5 mL de água Milli-Q (3,33mM de dextrana contém 184,8mM de glicose) e adicionado 3g de periodato de sódio (CARDIAS, 2000). Esta quantidade corresponde a dois moles de periodato por molécula de glicose. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, a solução foi dializada em 5 mL de água Milli-Q à temperatura ambiente mudando-se a água 5 vezes durante o processo a cada 3 h em câmara fria a 4°C. A solução de polialdeído foi usada no mesmo dia ou então guardada em congelador.

3.2.14 Estabilização com polidextranas

Após a imobilização em gel glioxil-agarose, um volume 9 vezes maior que a massa de gel de agarose da solução de polidextrana, preparada como no item 3.2.12. foi adicionado à solução de imobilização e mantidos sob essa condição por 24 h a 25°C. Logo em seguida, a etapa de redução do gel foi feita usando 1mg de NaBH_4 para 1mL de solução (CARDIAS, 2000).

3.2.15 Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína da preparação enzimática comercial de hidantoinase foi quantificado pelo método de Bradford, 1976, baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Para a determinação de proteínas, 100µl de amostra foram adicionados em 5 mL da solução de Bradford e mantido sob repouso por 5 min. A leitura foi realizada a 595nm. Este método foi selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, presentes em algumas das amostras de enzimas. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg/mL.

3.2.16 Determinação da atividade da D-hidantoinase livre

A atividade da D-hidantoinase foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia adaptada de Morin (1993). Uma massa de 10,5 mg de enzima em pó foi solubilizada em 1mL de tampão borato 100mM pH 9,0 e esta solução enzimática foi adicionada em 10 ml da solução de hidantoína 100mM. O sistema reacional foi mantido sob agitação durante 30 min a 30°C. A cada 5 min, alíquotas de 400 µL dessa solução era adicionada a 1,4 µL de ácido tricloroacético (TCA) 12% para a inativação da enzima e adicionado 200 µL de dimetilaminobenzaldeído (PDAB) (10%) em HCl 6,0M. Após 10 min, essa solução foi centrifugada (10.000 rpm) por 2 min a 20°C. A quantidade do produto formado (Ácido Hidantóico) foi determinada por espectrofotometria a 450 nm em cubeta de vidro, utilizando a curva de calibração previamente elaborada. Uma unidade de hidantoinase (U) foi definida como a quantidade de enzima que gera 1µmol de ácido hidantóico por minuto a 30°C e pH 9,0. A atividade foi calculada pela equação 3.5.

$$Atividade(UI / ml) = \frac{\alpha \times V_{reator}(ml)}{V_{enzima}(ml)} \quad (3.5)$$

Em que: α é a concentração de ácido hidantóico produzida por min; V_{reator} é o volume do meio reacional e V_{enzima} é o volume de enzima adicionada na reação de hidrólise do substrato.

3.2.17 Determinação da atividade da D-hidantoinase imobilizada

A atividade da D-hidantoinase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise conforme metodologia adaptada de Morin (1993). Uma massa de 0,1g do derivado imobilizado foi colocado em reação com 5mL de hidantoína 100mM mantendo

sob agitação. Durante tempos pré-determinados, uma alíquota de 400 μL dessa solução foi retirada com um filtro e adicionada a 1,4 μL de ácido tricloroacético (TCA) 12% para interromper a reação e 200 μL de dimetilaminobenzaldeído (PDAB) (10%) em HCl 6,0M. A quantidade do produto formado (Ácido Hidantóico) foi determinada fazendo-se a leitura em espectrofotômetro a 450 nm em cubeta de vidro utilizando a curva de calibração previamente elaborada.

3.2.18 Estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada

O efeito da temperatura na estabilidade da D-Hidantoinase livre e imobilizada foi determinado por meio da incubação de 0,1g da enzima livre e do derivado a 70°C em tampão borato (100mM) pH 9,0. Em intervalos regulares de tempo, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. A atividade enzimática no início foi considerada como 100% e nas amostras retiradas nos intervalos de tempo pré-determinados, mediram-se a atividade enzimática, expressa como porcentagem da atividade inicial. Um modelo de dois parâmetros proposto por Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica. O modelo admite decaimento segundo uma reação de 1ª ordem para a fração $(1-\alpha)$ da enzima, sendo α uma constante conforme mostra a equação 3.5.

$$a_R = (1 - \alpha) \times \exp(-kt) + \alpha \quad (3.6)$$

Sendo a_R atividade relativa (adimensional); α é a relação entre a atividade específica no estado final A e no estado inicial A_1 ; k constante de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}). O parâmetro k descreve o processo de desdobramento ou inativação enzimática e α , o nível de estabilização da atividade. Fatores de estabilidade (FE) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dos derivados e o tempo de meia vida da enzima livre nas mesmas condições do ensaio.

3.2.19 Análise de aminoácidos de D-hidantoinase solúvel e imobilizada

Enzima livre e imobilizada (ambos contendo aproximadamente 2mg de proteína) foram hidrolisados em HCl (6,8M) a 105°C por 24h. A mistura foi seca a 75°C por 24h. O extrato de aminoácidos foi dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2M, pH 2,2 e a

suspensão foi centrifugada a $10.000\times g$ por 4 minutos. Diluiu-se a parte líquida em ácido tricloroacético 10% v/v em 1/1 e centrifugou-se novamente.

A análise de aminoácidos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seguiu o método da Waters Pico-Tag[®]. Antes da separação em coluna, os aminoácidos presentes na amostra reagiram com PITC formando derivados de PTC.

3.2.20 Estimativa da carga máxima de hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose e epóxi-quitosana-alginato

Ensaio de capacidade máxima de imobilização de D-hidantoinase foram realizados para os melhores derivados ativados com glicidol (glioxil-agarose) e com grupos epóxi (quitosana-alginato-epoxilada) As cargas enzimáticas oferecidas variaram de 2,5 a 200 mg de enzima g^{-1} de gel, de acordo com procedimentos de imobilização descritos nos itens 3.2.9 e 3.2.10, respectivamente.

3.2.21 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

A estimativa da massa molecular da enzima D-hidantoinase foi realizada por eletroforese em condição desnaturante – SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) em um sistema Hoefer mini VE da Amershan Pharmacia Biotech.

As amostras foram preparadas com a adição de tampão de ruptura a uma solução da enzima 2,2 mg/mL, na proporção de 1 : 2 v/v (tampão : amostra) e a mistura foi aquecida a 100°C por 5 min. O tampão de ruptura utilizado era composto por uma solução tampão de Tris-HCl (0,125 M, pH 6,8), solução de SDS (4% m/v), azul de bromofenol (0,025% m/v), glicerol (20% v/v) e agente redutor β -mercaptoetanol (0,1 M). Um volume de 10 μ L da amostra preparada foi aplicado no gel de poliacrilamida composto por um gel de empilhamento de 4% seguido de um gel de resolução de 10%. O sistema de eletroforese foi então submetido a uma corrente de 15 mA durante a migração das proteínas no gel de empilhamento e de 20 mA durante o gel de separação. O gel foi revelado com solução corante de Coomassie Brilliant Blue G-250 por 30 min. Ao final, o gel foi incubado em uma solução descorante composta por etanol (25 % v/v), ácido acético (8 % v/v) e água destilada.

A massa molecular da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 15 a 220 kDa (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen[®]), 10 a 225kDa (*Broad Range Protein Molecular Weight Markers* – Promega) e 14,4 a 94kDa (*Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis* -

Amershan Pharmacia Biotech), além do software de digitalização de imagens Doc. It LS – UVP, utilizado para a fotodocumentação das análises realizadas.

Foi realizada também uma análise por SDS-PAGE da enzima imobilizada em agarose para avaliar se sob condições desnaturantes ocorreria o desprendimento de subunidades da enzima imobilizada ou se todas as quatro cadeias polipeptídicas da D-Hidantoinase estariam ligadas covalentemente ao suporte. Para esta análise, 20 mg do derivado foi incubado em 100 μ L de tampão de ruptura, e 10 μ L da mistura foi submetida à análise em gel de poliacrilamida 10%.

3.2.22 Preparo das amostras injetadas nos cromatógrafos

Soluções estoque das amostras utilizadas foram preparadas nas concentrações de 20 μ g/ml, solubilizadas na fase móvel ou em água deionizada.

3.2.23 Protocolo padrão para produção do N-carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise básica da D,L-fenilhidantoína.

A hidrólise da D,L-fenilhidantoína para gerar o N-carbamoil correspondente foi feita em um reator encamisado de 50mL a 30°C, contendo 20 mL de tampão borato/KCl 0,1M, pH 9,0, 20mM de fenilhidantoína e 194UI de D-hidantoinase de *Vigna angularis*, segundo metodologia adaptada Arcuri *et al*, 2000. A mistura reacional foi mantida sob suave agitação mecânica até que a reação se totalizasse. No decorrer da reação foram retirados alíquotas de 1ml que foram posteriormente tratadas com 1 mL de acetonitrila para precipitação da proteína. Em seguida o pH foi ajustado para 7,0 e as amostras centrifugadas durante 5 min, a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e analisado em HPLC no sistema da Waters, na coluna OD C-18, fase móvel metanol/água (70:30), volume de injeção 10 μ l a 25°C. Após o término da reação adicionou-se HCl concentrado para precipitação do produto desejado. Esta metodologia de hidrólise foi a mesma utilizada para a enzima livre e imobilizada. O sistema de hidrólise utilizado esta melhor esquematizado na Figura 3.2.

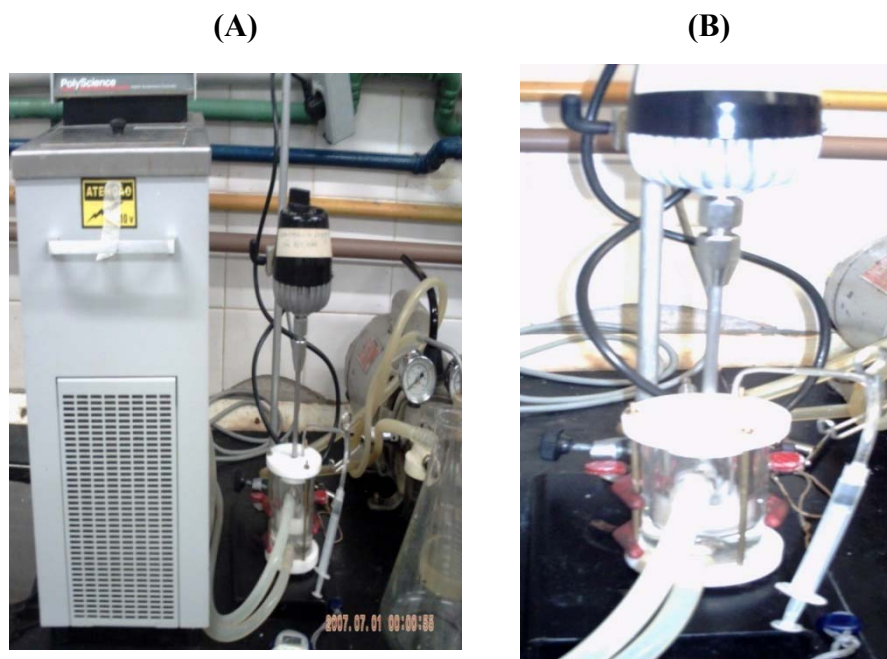


Figura 3.2. Foto representativa da reação de hidrólise: (A) sistema completo e (B) somente o reator e agitador mecânico.

3.2.24 Caracterização do N-carbamoil-D-fenilglicina através da técnica de infravermelho.

✓ **D,L-fenilhidantoína:**

I.V. ($\nu_{\text{máx.}}$, KBr, cm^{-1}): 3311, 2942, 2766, 1718, 1553, 1280, 1021, 849, 755.

✓ **N-carbamoil-fenilglicina:**

I.V. ($\nu_{\text{máx.}}$, KBr, cm^{-1}): 3145, 2103, 1615, 1509, 1350, 1125, 911, 735, 669.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da enzima solúvel

4.1.1 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

Devido à frágil estrutura terciária das enzimas, pequenas alterações na temperatura podem provocar variações na estrutura sendo essas reversíveis ou irreversíveis, o que pode ocasionar a perda da capacidade de atuar como catalisador. Para verificar a influência da temperatura sobre a atividade catalítica de D-hidantoinase, a mesma foi determinada no intervalo de 20 a 80°C e os resultados estão mostrados na Figura 4.1, em termos de atividade relativa. Observa-se que há uma faixa ótima de temperatura entre 50-70°C, sendo a temperatura de máxima atividade 60°C. Após 80°C foi verificada uma queda acentuada da atividade enzimática chegando à quase total inativação.

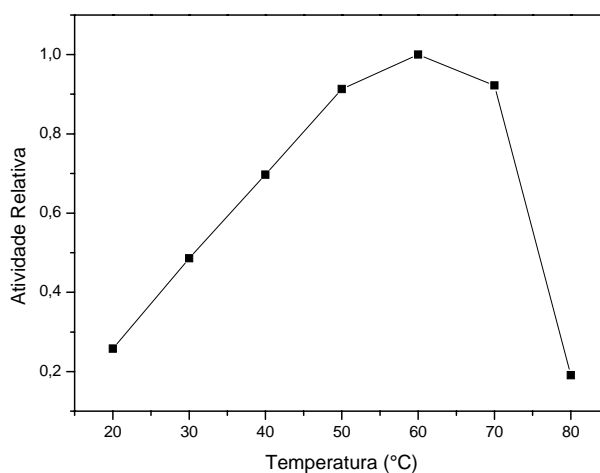


Figura 4.1. Influência da temperatura sobre a atividade da D-Hidantoinase solúvel.

Atualmente, são encontrados vários estudos da influência de temperatura para várias D-hidantoinases como a temperatura ótima da hidantoinase de *Methanococcus jannaschii* que foi de 80°C (CHUNG et al, 2002). Durhan e Weber (1995), ao estudarem D-hidantoinase de *Agrobacterium tumefaciens*, verificaram que esta enzima apresentava temperatura ótima a 70°C. A temperatura ótima de D-Hidantoinase proveniente de *Vigna angularis*, encontrada neste trabalho, é a primeira a ser relatada em toda literatura.

4.1.2 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Um dos mais importantes parâmetros da atividade enzimática é o pH, uma vez que a concentração de hidrogênio no meio pode afetar a estrutura terciária da enzima e o grau de ionização de substratos, produtos e de resíduos que fazem parte do sítio ativo. O efeito do pH na atividade da enzima livre foi investigado e os resultados são mostrados na Figura 4.2. Fica evidente que o pH de máxima atividade da enzima livre foi 10, mostrando o caráter básico da enzima, o que torna interessante imobilizá-la multipontualmente em pH 10,05.

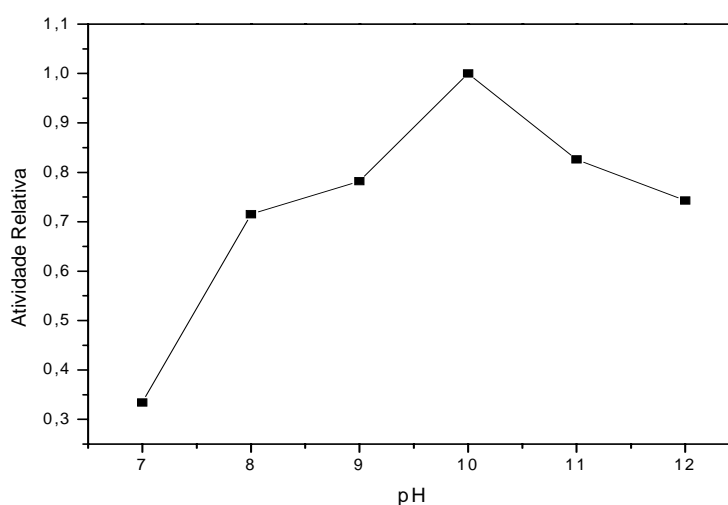


Figura 4.2. Influência do pH na atividade da D-Hidantoinase livre medido a 30°C.

Os valores de pH ótimo para hidantoinases de *Bacillus* sp. AR9 (SHARMA e VOHRA, 1997 *apud* CHUNG et al, 2002), *Agrobacterium tumefaciens* (DURHAM e WEBER, 1995) e *Pseudomonas fluorescens* DSM84 (MORIN et al, 1986 *apud* CHUNG et al, 2002) se encontram no intervalo de pH de 8,5-10. Não há na literatura dados que se referem ao valor de pH de D-hidantoinase de *Vigna angularis* como apresentado no presente estudo.

4.2 Imobilização da D-hidantoinase em gel glioxil-agarose 6BCL

As condições de imobilização da D-hidantoinase neste suporte são aquelas estabelecidas por Guisán (1988), ou seja, 25°C, pH 10,05.

A D-hidantoinase foi inicialmente imobilizada em suporte glioxil-agarose 6BCL (ativado com concentração de grupos aldeídos 75 μ moles de grupos aldeídos/mL de gel)

na ausência de ácido hidantóico, por 3 h de reação e com carga enzimática de 2,5 mg de proteína/g de suporte. A Figura 4.3. apresenta a cinética de imobilização.

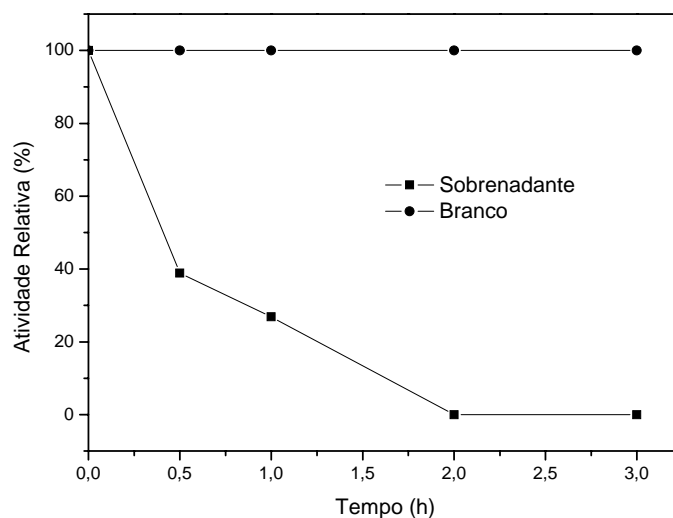


Figura 4.3. Acompanhamento da cinética de imobilização de D-hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose 6% a 25°C, pH 10,05, na ausência de ácido hidantóico.

A enzima solúvel (branco) manteve-se ativa durante as 3 horas de reação. Em 30 min de imobilização, 60% da atividade inicial oferecida desapareceu do sobrenadante e após 2 h de incubação, toda enzima havia sido imobilizada, com rendimento de imobilização de 100%.

Após as 3 horas de imobilização, foi realizada a etapa de redução com NaBH_4 . Para muitas enzimas ocorre uma grande perda de atividade, pois o borohidreto rompe algumas ligações presente nas enzimas, como ligações de dissulfeto, o que justificaria a atividade recuperada de 42%. Para este derivado o fator de estabilidade foi de 22 vezes, em relação à enzima solúvel.

A primeira ligação que ocorre entre a enzima e o suporte é muito rápida. Entretanto, um tempo longo de imobilização é necessário para a formação de novas ligações covalentes multipontuais, o que poderia levar a uma maior estabilização da enzima imobilizada. Por outro lado, o excesso de ligações entre enzima e suporte pode distorcer a estrutura tridimensional da enzima, causando a perda da atividade catalítica. Para verificar a influência do tempo de imobilização sobre as propriedades catalíticas do derivado, foi realizada a imobilização da hidantoinase durante 24 h e 48h, nas mesmas

condições adotadas para a imobilização em 3 h. Assim, aumentando-se o tempo de imobilização espera-se aumento na estabilidade e diminuição da atividade recuperada devido a maior possibilidade de ocorrer distorção da enzima.

Estes derivados também apresentaram total imobilização da enzima. No entanto, a atividade recuperada foi de 35% para o tempo de imobilização de 24h e 31% para o de 48h e o fator de estabilidade foi de 72 e 26, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, o tempo de imobilização foi um importante parâmetro para a estabilização do derivado. A ligeira redução da atividade recuperada obtida pelo aumento do tempo de imobilização se deve ao maior número de interações covalentes entre a enzima e o suporte que permite aumentar a estabilidade térmica dos derivados, mas diminui a sua atividade hidrolítica. Observa-se na Figura 4.4. que o tempo de meia-vida da enzima imobilizada aumentou com o tempo de imobilização.

Foram investigadas outras estratégias para aumentar o valor de atividade recuperada. Essas estratégias envolveram o uso de íons e de substrato durante a imobilização da enzima.

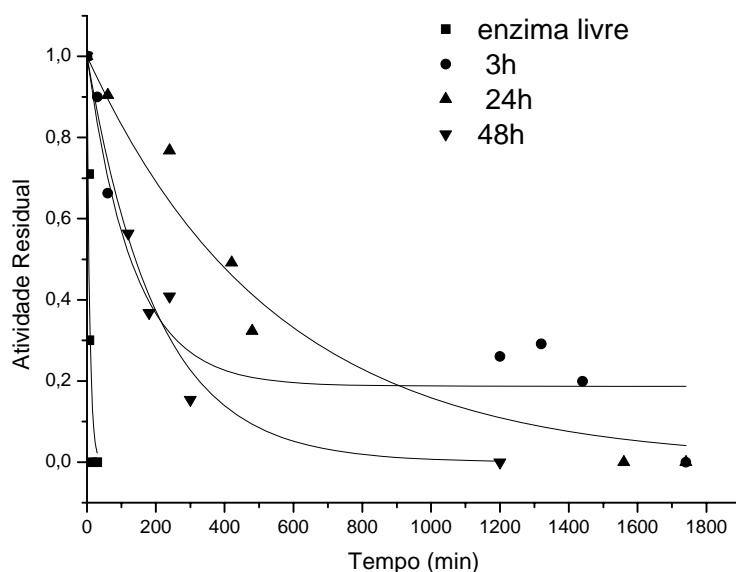


Figura 4.4. Inativação térmica a 70°C, de D-hidantoinase solúvel e de seus derivados em gel glioxil-agarose 6BCL com ■ enzima livre, ● 3h, ▲ 24h e ▼ 48h de imobilização.

4.2.1 Utilização de íons bivalentes como protetores da D-hidantoinase

A imobilização na presença de íon e/ou substratos da enzima permite modificação do seu sítio ativo, com direcionamento da atividade catalítica de acordo com o processo de interesse (BLANCO et al, 1989).

Morin (1993) relatou que D-hidantoinases são enzimas metalodependentes. A presença de um íon na solução de imobilização pode minimizar mudanças conformacionais prejudiciais à molécula de proteína, protegendo a enzima de efeitos negativos do borohidreto de sódio durante a etapa de redução. Raí e Taneja (1998) relataram que o íon Mn^{2+} melhora a atividade e a estabilidade da D-hidantoinase. Powell et al, 1994; Kishan et al, 2005 relataram também o uso de outros íons como: Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} entre outros, para melhorar a atividade de D-hidantoinases. Para Chung et al, (2002) os íons Mg^{2+} foram os mais efetivos para a atividade da hidantoinase de *Methanococcus jannaschii*. D-hidantoinases de *Pseudomonas fluorescens* foi ativada por Fe^{2+} e Mn^{2+} (MORIN et al, 1986 *apud* CHEON et al, 2002). As hidantoinases de *Bacillus circulans* foram estimuladas pelos íons Co^{2+} , Ni^{2+} e Mn^{2+} , mas a hidantoinase de *Agrobacterium tumefaciens* não foi afetada por íons metálicos.

A grande perda na atividade recuperada pode ser atribuída à redução do íon metálico, na etapa de redução com $NaBH_4$, uma vez que D-hidantoinase é uma metaloenzima. Esse fato foi observado por TARDIOLI (2003) quando estudou a imobilização de CPA (enzima zinco dependente) em glioxil-agarose. Pedroche et al (2007) também relataram que a presença de $NaBH_4$ pode ter efeitos deletérios na estrutura da proteína devido à clivagem de ligações dissulfeto e peptídicas.

Nesta etapa, investigou-se a influência de Mn^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} na atividade catalítica da D-Hidantoinase durante a etapa de redução. Estes íons foram selecionados baseados em estudos de outras D-hidantoinases nas quais os centros ativos possuem íons Mn^{2+} ou Zn^{2+} (KISHAN et al, 2005).

Realizaram-se quatro imobilizações de D-hidantoinase em glioxil-agarose e 1 glutaraldeído-agarose (82 μ moles de grupos aldeídos/mL de gel) por 3 h em pH 10,05 a 25°C. As imobilizações foram rápidas e com rendimento de imobilização de 100% (após 2 h de reação, nenhuma atividade foi observada no sobrenadante da suspensão de imobilização) e a enzima solúvel (branco) manteve-se ativa durante as 3 h de reação. Logo após, na etapa de redução com borohidreto de sódio, foi adicionado 10 mM de Mn^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} . Os resultados das imobilizações estão na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Influência de íons na atividade e estabilidade durante a redução dos derivados de D-hidantoinase, imobilizados em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 por 3h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.

Íons presentes na redução	Rendimento de imobilização (%)	Ar (%)	$K_d \times 10^{-3} \pm \sigma$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	FE
----	100	42	$0,249 \pm 1,63$	2	22
Mn^{2+}	100	43	$0,049 \pm 0,10$	2,8	31
Zn^{2+}	100	66	$0,014 \pm 0,00$	3,5	38
Mg^{2+}	100	84	$0,342 \pm 0,01$	2,3	25
Zn^{2+} a	100	17	$0,002 \pm 0,00$	4,5	49

a: glutaraldeído-agarose

Os resultados da Tabela 4.1. mostram que a presença de Mn^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} na etapa de redução protegem a enzima, aumentando a recuperação de atividade e a estabilidade. Observa-se que na presença de íons Mg^{2+} , a atividade recuperada foi de 84% e um tempo de meia-vida de 2,3h, 25 vezes mais estável em relação à enzima livre e similar estabilidade em relação à enzima imobilizada sem a presença de íon na etapa de redução. Entretanto, na presença do íon bivalente zinco, a atividade recuperada foi de 66% e permitiu estabilizar mais a enzima (38 vezes). Possivelmente, o íon Zn^{2+} protegeu o sítio ativo da enzima, reduzindo o efeito da temperatura na inativação do derivado. De acordo com trabalhos relatados na literatura, hidantoinases de diferentes procedências possuem em seu sítio ativo íons Zn^{2+} (POWELL et al, 1994; CHEON et al, 2002). Powell et al (1994) observaram que a presença de íons bivalentes durante a imobilização de hidantoinase estabiliza termicamente o derivado, se comparado com os derivados imobilizados na ausência de íons, mostrando um efeito similar ao presente trabalho.

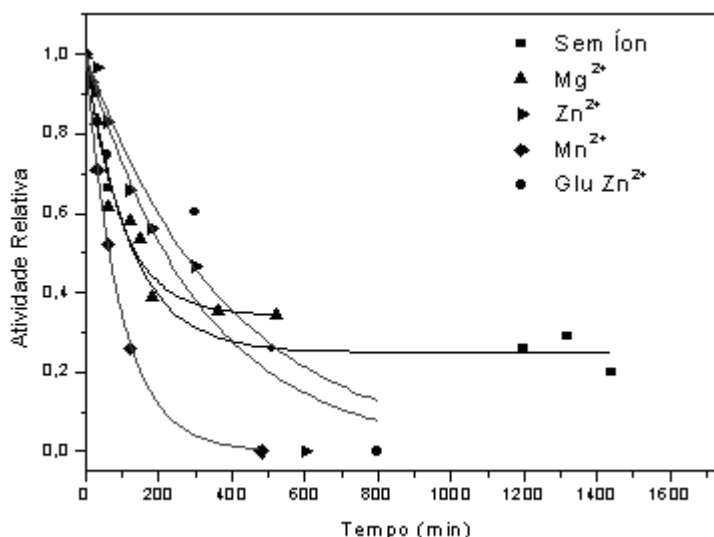


Figura 4.5. Inativação térmica a 70°C, de derivados de D-hidantoinase imobilizados em glioxil-agarose 6% BCL e glutaraldeído-agarose, reduzidos na presença de Mn²⁺, Zn²⁺ e Mg²⁺.

Glutaraldeído tem sido muito usado para introduzir ligações intramoleculares em proteínas ou para modificar proteínas adsorvidas em suportes aminados (BETANCOR et al, 2006). A imobilização em agarose ativada com glutaraldeído resultou em um derivado com o tempo de meia-vida de 4,5 h, 49 vezes mais estável que a enzima livre, entretanto esse derivado apresentou uma baixa recuperação de atividade devido à alta reatividade do glutaraldeído, o qual pode ser polimerizado sobre a superfície do suporte prejudicando a difusão do substrato, bem como distorcendo o centro ativo da enzima durante a imobilização (ALONSO et al, 2005).

4.2.2 Influência do tempo de imobilização na presença de zinco durante a redução

Dentre os resultados apresentados, a suplementação de íons Zn²⁺ na etapa de redução foi importante na estabilização dos derivados. May et al (1998) estudando a hidantoinase de *Arthrobacter aurescens* DSM 3745, observou que o zinco era essencial não apenas para a atividade catalítica, mas também para a estabilização da estrutura quaternária da hidantoinase.

Baseando-se nesses resultados, investigou-se a influência do tempo de imobilização sobre a estabilidade térmica da enzima. Primeiramente, a D-hidantoinase, foi imobilizada em glioxil-agarose, com 76 µmoles de grupos aldeídos/mL de gel, a 25°C (pH 10,05), por 3 a 72 h. Logo após o tempo de imobilização, foi adicionado 10 mM do íon em

cada imobilização na etapa de redução com borohidreto. Os resultados das imobilizações estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Influência do tempo de imobilização dos derivados de D-hidantoinase imobilizados em glioxil-agarose na presença de íons Zn^{2+} na etapa de redução a 25°C, pH 10,05, com $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.

Tempo de Imobilização (h)	Rendimento de imobilização (%)	Ar (%)	$K_d \times 10^{-3} \pm \sigma$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	FE
3	100	66	$0,049 \pm 0,10$	3,6	40
24	100	58	$0,014 \pm 0,00$	8,1	89
48	100	37	$0,213 \pm 0,00$	4,0	44
72	100	36	$0,008 \pm 0,092$	1,7	18

Os derivados de D-Hidantoinase, reduzidos na presença do íon Zn^{2+} , foram incubados em tampão borato pH 9,0 (100 mM) a 70°C. As atividades residuais foram medidas a 30°C sobre a hidrólise da hidantoína. De acordo com a Tabela 4.2, a atividade recuperada dos derivados reduziu com o aumento do tempo de imobilização, conforme descrito anteriormente. Os tempos de meia-vida dos derivados variaram entre 1,7 e 8,1 h, quando imobilizados em 72 e 24 h, respectivamente. O derivado imobilizado em 24 h foi o derivado mais estável, 89 vezes mais estável que a enzima solúvel. O aumento do tempo de imobilização de 3 para 24 h, permitiu aumentar consideravelmente a estabilidade térmica da enzima da ordem de 2,5 vezes, mostrando que o aumento do tempo de imobilização está intimamente relacionado com o aumento da estabilidade térmica dos biocatalisadores. No entanto, verifica-se que para tempos de imobilização superiores a 24 h, houve uma redução do fator de estabilidade. Em 48 h, o perfil cinético de inativação da enzima foi similar ao derivado imobilizado em 3 h (Figura 4.6), estabilizando em 44 vezes quando comparado com a enzima solúvel. Quando o tempo de imobilização foi de 72 h, o fator de estabilidade decresceu 18 vezes em relação ao derivado obtido em 24 h. Este comportamento também foi observado em estudos realizados por Tardioli (2003) sobre a imobilização de carboxipeptidase (CPA) em géis glioxil-agarose. Pode-se supor que essa redução na estabilidade ocorre porque com o aumento do tempo de imobilização, aconteça uma multi-interação intensa e essa distorce muito a estrutura molecular, inativando uma boa fração de enzimas e deixando outras muito frágeis, ou seja, enfraquecendo ligações que mantém a integridade da estrutura molecular, mas não inativando. Ao variar as

condições do meio (alta temperatura) essas ligações fragilizadas podem romper-se mais facilmente, inativando a enzima.

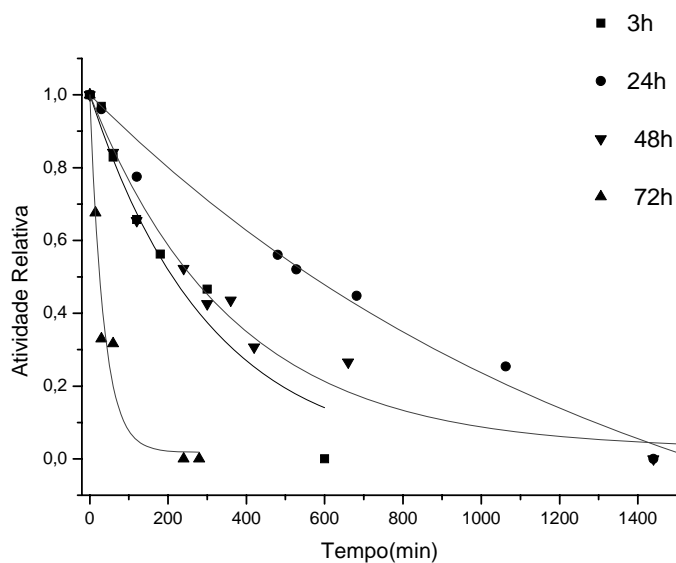


Figura 4.6. Inativação térmica da D-hidantoinase a 70°C em diferentes tempos de imobilização.

4.2.3 Uso de ácido hidantóico na imobilização e de íons na etapa de redução

Primeiramente, a D-hidantoinase foi imobilizada em glioxil-agarose com 82 μ moles de grupos aldeídos/ml de gel a 25°C (pH 10,05), por 3 h de reação com adição simultânea de 10mM de ácido hidantóico. Logo em seguida, na etapa de redução, utilizaram-se os dois melhores íons protetores, Zn^{2+} e Mg^{2+} .

Como mostrado anteriormente, a atividade recuperada dos derivados incubados na presença somente de íons Mg^{2+} e Zn^{2+} , foi de 84 e 66% respectivamente. A suplementação de ácido hidantóico, produto da reação de hidrólise da enzima em estudo, durante a imobilização reduziu a atividade recuperada dos derivados em 56 e 32% quando incubados com os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Influência do ácido hidantóico na atividade e estabilidade durante imobilização e redução derivados de D-hidantoinase na presença de íons, imobilizados em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 por 3 h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h a 70°C.

Imobilização	Redução na presença de $NaBH_4$	R_I (%)	A_R (%)	$K_d \times 10^{-3} \pm \sigma$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	FE
Ácido Hidantóico	Com Mg^{2+}	100	56	$1,58 \pm 0$	7,3	80
Ácido Hidantóico	Com Zn^{2+}	100	32	$1,97 \pm 0$	5,9	65

Verificou-se que a adição de ácido hidantóico reduziu a afinidade da enzima pelo substrato. Mesmo após sucessivas lavagens dos derivados após a imobilização, alguns traços de ácido hidantóico permaneceram ligados ao sítio ativo da enzima, mostrando que o produto da reação exerce um efeito de inibição à enzima, resultando, portanto, na redução da atividade catalítica da enzima.

A suplementação de ácido hidantóico foi importante para a estabilização térmica dos derivados como observado na Tabela 4.3. Derivados imobilizados na ausência deste composto, mas com a presença de íons na etapa de redução, o fator de estabilização foi de 25 e 38 quando reduzidos na presença de Mg^{2+} e Zn^{2+} . No caso do derivado reduzido na presença de Mg^{2+} , a suplementação de ácido hidantóico aumentou para 80 vezes o fator de estabilidade. Para o derivado reduzido na presença de Zn^{2+} , a estabilização foi aumentada para 65 vezes. Estes resultados ressaltam a hipótese de que o ácido hidantóico interage com o sítio catalítico da enzima, protegendo a enzima da influência da temperatura. O perfil cinético de inativação da enzima imobilizada na presença de ácido hidantóico é mostrado na Figura 4.7.

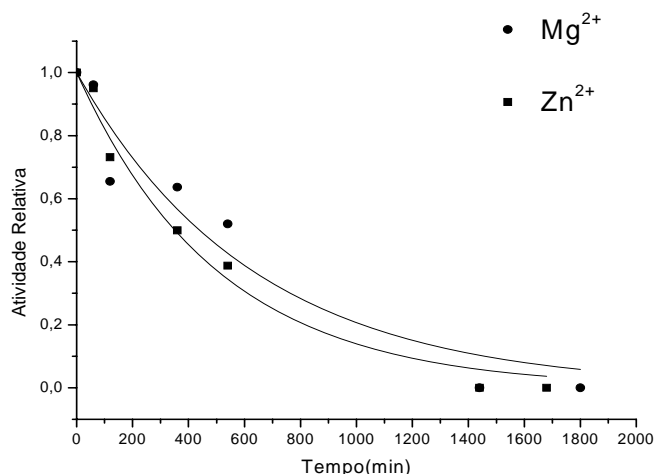


Figura 4.7. Inativação térmica de D-hidantoinase a 70°C, na presença de ácido hidantóico durante a imobilização e íons protetores durante etapa de redução com borohidreto.

Em ambos os casos, o perfil de inativação foi similar. Após 27 h de incubação a 70°C, total inativação dos derivados foi observada para o derivado reduzido na presença de íon Zn^{2+} . Porém, para o derivado reduzido na presença de íons Mg^{2+} , a inativação total do derivado foi verificada após 30 h, mostrando um ligeiro acréscimo na estabilidade térmica quando se utilizou este íon.

Com o intuito de aumentar a estabilidade térmica deste derivado, foi empregada a técnica de entrecruzamento da enzima com polidextrana após a imobilização. A dissociação de subunidades de enzimas multiméricas é um dos principais fatores da inativação da estrutura quaternária das enzimas (CARDIAS, 2000; MATEO et al, 2006b). Esta estratégia tem sido amplamente empregada na estabilização térmica de enzimas multiméricas (CARDIAS, 2000; MATEO et al, 2006b). Enzimas multiméricas entrecruzadas por polidextrana, após a imobilização, como β -galactosidase de *Thermus* spp. e α -aminoácido éster hidrolase de *Acetobacter turbidans* foram mais estáveis termicamente se comparadas com os derivados não entrecruzados (MATEO et al, 2006b). No entanto, foi verificada redução da atividade recuperada destes derivados decorrente das limitações difusionais ocorridas após o entrecruzamento (MATEO et al, 2006b). Neste estudo, foram testadas D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-agarose na presença de ácido hidantóico. O volume de polidextrana foi de 27 ml. De acordo com os resultados obtidos, após o entrecruzamento, foi verificada total inativação do derivado não-reduzido com $NaBH_4$. Possivelmente, o entrecruzamento com a polidextrana promoveu a interação

de seus grupos aldeído com o sítio ativo da enzima. Esta classe de enzimas possui grupos lisina em seu sítio ativo (KISHAN et al, 2005), o que pode ter interagido covalentemente com a polidextrana e inativando a enzima. Em suma, o entrecruzamento de derivados de D-hidantoinase com polidextrana não foi uma boa alternativa para a estabilização do derivado.

4.2.4 Influência do tempo de imobilização na presença de ácido hidantóico e Mg^{2+}

A multi-interação enzima-suporte é um processo lento (MATEO et al, 2006). Estas multi-interações são favorecidas com o aumento do tempo de imobilização, conferindo maior estabilidade aos derivados. Neste contexto, foi avaliado o aumento do tempo de imobilização de D-hidantoinase na presença de ácido hidantóico. Os resultados referentes à influência da adição deste ácido durante a imobilização sobre as propriedades catalíticas dos derivados são mostrados na Tabela 4.4. Nota-se que o aumento do tempo de imobilização na presença de ácido hidantóico reduziu drasticamente a atividade hidrolítica da enzima, o mesmo pode ser observado para a estabilidade térmica. Esta redução sobre a atividade hidrolítica e estabilização térmica pode ser explicada pela intensa interação deste ácido com o sítio ativo da enzima, ocasionando a formação de um complexo enzima-ácido bastante estável que inativou a enzima. Mesmo após sucessivas lavagens com água bidestilada, não foi possível recuperar a atividade inicial da enzima. Com o aumento do tempo de imobilização esta interação foi favorecida, ocasionando perda total da atividade enzimática após 72 h de imobilização.

Tabela 4.4 Influência do tempo de imobilização de D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-agarose na presença de ácido hidantóico na imobilização e íon Mg^{2+} na etapa de redução em glioxil-agarose a 25°C, pH 10,05 com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ h.

Imobilização	Redução na presença de $NaBH_4$	R_I (%)	A_R (%)	$t_{1/2}$ (h)	FE
Ácido Hidantóico	Mg^{2+} (3h)	100	56	7,3	80
Ácido Hidantóico	Mg^{2+} (6h)	100	42	2,64	28,87
Ácido Hidantóico	Mg^{2+} (24h)	100	10	—	—
Ácido Hidantóico	Mg^{2+} (48h)	100	5	—	—
Ácido Hidantóico	Mg^{2+} (72h)	100	0	—	—

De acordo com os resultados apresentados, o melhor derivado obtido foi D-hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose por 24 h na presença do íon zinco na etapa de redução com borohidreto de sódio, com rendimento de imobilização de 100% e 58% de atividade recuperada e fator de estabilização de 89 vezes, em relação à enzima solúvel (Tabela 4.2 página 55). No entanto, a agarose é um suporte de alto custo e como alternativa foram testados géis de quitosana, um suporte com baixo custo e com propriedades físicas e químicas que possam promover a estabilização da enzima D-hidantoinase.

4.3 Imobilização da D-hidantoinase em géis de quitosana

Quitosana tem sido muito empregada na imobilização de enzimas e a sua utilização proporciona resultados satisfatórios na estabilização de enzimas de diferentes fontes como lipases, tripsina, quimotripsina, celulase, β -galactosidase. Estes estudos vêm sendo realizados no Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFSCar, com resultados promissores, mostrando que a quitosana é um suporte atraente na imobilização e estabilização de enzimas devido ao seu baixo custo em relação às matrizes disponíveis comercialmente. No presente trabalho, foi empregado dois tipos de géis de quitosana sintetizados em laboratório como alternativa ao gel de agarose. Na Tabela 4.5. são apresentados os parâmetros de imobilização de D-hidantoinase imobilizada em glioxil-quitosana e quitosana-alginato epoxilada.

Tabela 4.5. Imobilização de D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-quitosana-alginato e quitosana-alginato-epoxilada na ausência ou na presença do íon Mg^{2+} ou ácido hidantóico a 25°C, pH 10,05 por 3 h e/ou 24h com carga oferecida de $6,8 \pm 1,3$ UI enzima g^{-1} of gel. Enzima livre: $t_{1/2} = 0,09$ a 70°C.

Tipo de suporte e agente de ativação	Imobilização	R_i (%)	Ar (%)	t_{1/2} (h)	FE
Glioxil-quitosana-alginato	Mg^{2+} (3h)	10%	0	—	—
Glioxil-quitosana-alginato	Mg^{2+} (24h)	29%	0	—	—
Quitosana-alginato-epoxilada	Sem íons (24h)	62%	0	—	—
Quitosana-alginato-epoxilada	Ácido Hidantóico (24h)	62%	0	—	—
Quitosana-alginato-epoxilada	Mg^{2+} (24h)	100	40	2,48	27,2

Observa-se que as imobilizações em quitosana ativadas com glicidol, mesmo em diferentes tempos, 3 h e 24 h, o rendimento de imobilização foi muito baixo, da ordem de 10% e 29% e o derivado não apresentou atividade. A inativação da enzima durante a etapa de imobilização em glioxil-quitosana-alginato se deve ao fato de que grupos amino livres da quitosana funcionam como sítios de adsorção de elevada afinidade por metais bivalentes, desnaturando assim a enzima. Como foi verificado anteriormente, D-hidantoinase é uma metaloenzima e a presença de íons durante a imobilização reduz a perda de atividade. O uso do gel de quitosana ativado com grupos glioxil reduziu drasticamente o rendimento de imobilização se comparado com a agarose. Possivelmente este baixo rendimento se deve à “pobre” congruência geométrica do gel de quitosana. Gel de agarose possui poros com geometria favorável ao processo de imobilização e estabilização e no caso da quitosana, a baixa porosidade da matriz pode ter influenciado negativamente na imobilização/estabilização da enzima. Resultados similares foram obtidos por Mendes et al, (2006) em imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosa* em gel de quitosana e quitosana-alginato. A utilização de géis híbridos favoreceu a imobilização da enzima, com considerável incremento sobre a atividade da enzima e a estabilização térmica do derivado em relação ao gel de quitosana sem a adição de outros biopolímeros. Isto se deve à formação de um suporte com maior porosidade e a alteração do microambiente interno que favoreceu a atividade catalítica da enzima.

De acordo com os resultados relatados acima, uma nova estratégia foi estudada na imobilização covalente da enzima em suporte com elevada concentração de grupos epóxidos ($220 \mu\text{moles.g}^{-1}$ de gel). Em geral, a imobilização de enzimas nestes suportes epóxido ocorre em duas etapas: (i) a adsorção física de proteínas por interações hidrofóbicas e (ii) após a adsorção, os grupos nucleofílicos da enzima reagem com os grupos epóxidos por ligação covalente. O procedimento de obtenção do suporte foi dividido em duas importantes etapas: (i) uma acetilação parcial dos grupos aminos da quitosana com anidrido acético, pois isso diminuiria a capacidade de adsorção de íons metálicos durante a imobilização e (ii) geração de grupos oxiranos através de reação com epícloridrina. Esse suporte foi testado na imobilização da D-hidantoinase no tempo mínimo de 24 h na ausência e na presença de ácido hidantóico ou Mg^{2+} . O melhor derivado obtido foi o quitosana-alginato epoxilado imobilizado na presença do íon Mg^{2+} , pois apresentou 100% de rendimento de imobilização e 40% de atividade recuperada. Este derivado foi 27,2 vezes mais estável que a enzima solúvel. D-hidantoinase imobilizada em glioxil-quitosana-alginato, nas mesmas condições reacionais (presença de íon Mg^{2+} por 24 h) imobilizou apenas 29% da atividade oferecida, no entanto, não foi possível quantificar a atividade catalítica do derivado. Esta inativação da enzima é decorrente da quelatação do íon bivalente pelos grupos amino livres da quitosana. É importante ressaltar que o suporte epoxilado, os grupos amino do suporte são parcialmente acetilados. De acordo com a literatura, quitosana é empregada em processos de purificação de águas para a remoção de metais pesados como mercúrio, cádmio, chumbo e outros pelo fato de que os grupos amino formam ligações coordenadas covalentes com estes íons (LI e BAI, 2005). Esse aumento no rendimento de imobilização também se deve ao fato de que os grupos epóxi do suporte são bastante reativos em pH alcalino e sofrem ataque nucleofílico de grupos reativos da enzima tais como hidroxilas, amino e SH, aumentando assim o fator de estabilidade. Na ausência do íon há um rendimento de imobilização de 62%, valor similar ao derivado imobilizado na presença de ácido hidantóico (Tabela 4.5). Porém, a adição de íon na imobilização, total imobilização da enzima foi observada. Isto mostra que a etapa de acetilação do suporte realmente foi importante para a imobilização e manteve a estrutura ativa da enzima e pode ser explicado também porque o íon Mg^{2+} atuou ácido de Lewis, protonando os grupamentos epóxidos e assim facilitando sua abertura para a total imobilização com a enzima (Clayden, 2000). Este comportamento foi observado por Adriano (2008) na imobilização de Carboxipeptidase A (CPA), uma enzima zinco dependente. Em gel de quitosana-alginato sem a etapa de acetilação e ativado com glicidol

ou epícloridrina foi observada uma baixa atividade hidrolítica e estabilização. No entanto, a utilização de quitosana-alginato acetilado e epoxilado possibilitou um incremento bastante significativo sobre estes parâmetros.

4.4 Avaliação do grau de interação entre enzima e suporte

A hidrólise ácida de hidantoinase solúvel e imobilizada em glioxil-agarose por 3 h foi realizada com o objetivo de investigar quais os aminoácidos estão relacionados com o processo de imobilização. Os aminoácidos hidrolisados obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Como a hidrólise ácida não cliva a ligação enzima e suporte, por diferença entre a concentração destes aminoácidos na enzima solúvel e após o processo de imobilização, pode-se, então, estimar os aminoácidos envolvidos na imobilização (MANRICH et al, 2008). Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.6. Foram analisados somente os aminoácidos presentes na superfície externa da enzima e que possam interagir com os grupos reativos do suporte como ácido glutâmico e aspártico e lisina.

Os aminoácidos ácidos glutâmicos e aspártico, juntamente com a treonina não se ligaram covalentemente com o suporte. As concentrações destes aminoácidos na enzima solúvel e imobilizada não foram alteradas após a imobilização. No entanto, a concentração de resíduos de lisina foi reduzida em torno de 33% para ambos os derivados no tempo de imobilização de 3h. Para o derivado com tempo de imobilização de 24h na presença de íons Zn^{2+} , o índice da concentração de lisinas foi reduzido em torno de 50%. Isto mostra que a imobilização de enzimas em géis glioxil é realizada pelo ataque nucleofílico dos resíduos de lisina aos grupos glioxil do suporte (BLANCO et al, 1989).

Tabela 4.6. Comparação entre percentual de aminoácidos quantificados para D-hidantoinase livre e imobilizada em agarose na presença de íons Zn^{2+} e Mg^{2+} durante a etapa de redução no tempo de imobilização de 3h.

Aminoácidos	LIVRE	Zn^{2+}	Mg^{2+}
	Área (%)	Média e DP (%)	Média e DP (%)
Ácido aspártico	7,95	9,7 ± 0,73	7,8 ± 0,79
Ácido glutâmico	16,70	15,9 ± 1,77	15,5 ± 3,38
Treonina	6,77	6,7 ± 0,90	6,3 ± 0,20
Lisina	16,40	10,7 ± 2,30	11,8 ± 1,31

De acordo com Blanco et al, (1989), a imobilização de tripsina em gel glioxil-agarose permitiu estabilizar a enzima cerca de 5000 vezes em relação à enzima solúvel e que 50%

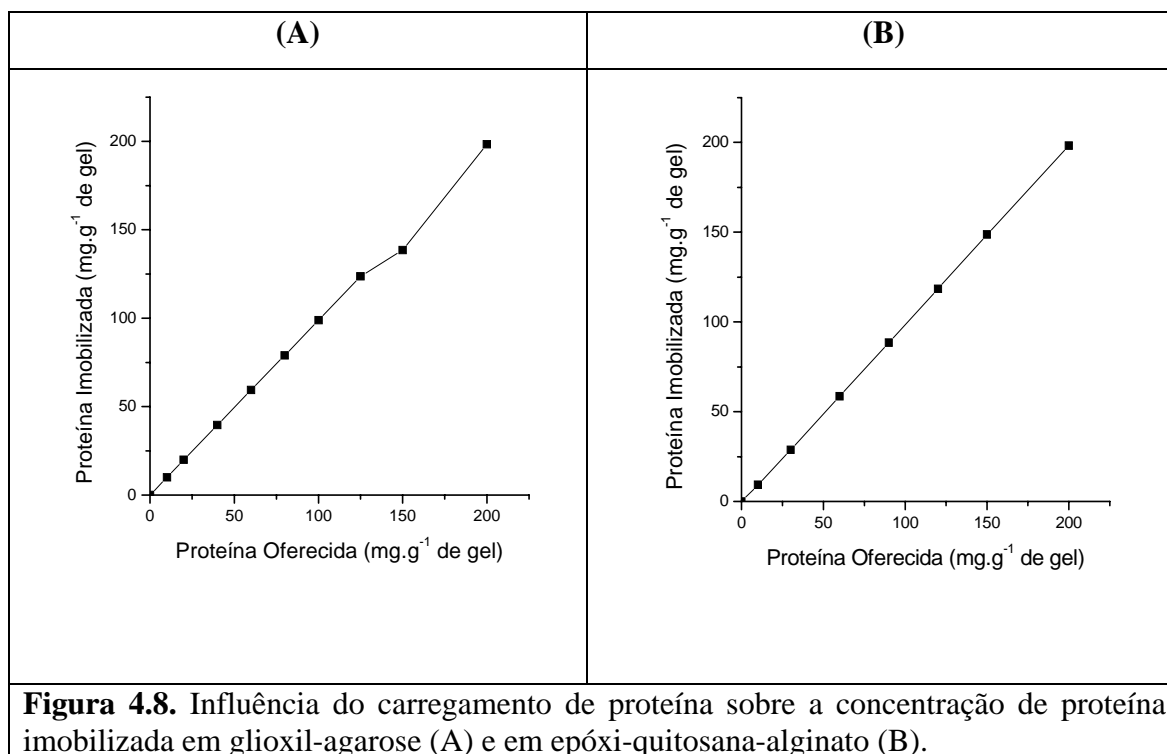
dos grupos lisina da enzima se ligaram covalentemente ao suporte. Tripsina também foi imobilizada covalentemente em géis de agarose e quitosana ativados via glicidol e glutaraldeído (MANRICH et al, 2008). Verificou-se que os géis glioxil, ativados via glicidol, foram ligados covalentemente aos grupos lisina e que cerca de 20% deste aminoácido estava envolvido na imobilização, mostrando que os dados apresentados no presente trabalho são similares aos reportados na literatura (BLANCO et al, 1989; MANRICH et al, 2008).

4.5 Capacidade máxima de imobilização da enzima em géis de agarose e epóxi-quitosana-alginato

Dentre as diversas estratégias de imobilização realizadas, foram selecionados os derivados imobilizados em glioxil-agarose reduzido na presença de íons Zn^{2+} e em quitosana-alginato epoxilada na presença de íons Mg^{2+} para a estimativa da concentração máxima de proteína imobilizada nestes suportes e a influência do carregamento sobre a atividade hidrolítica destes derivados. A concentração de proteína oferecida foi de 2,50 a 200mg de proteína/g de suporte. A Figura 4.8 mostra o perfil de imobilização de hidantoinase em glioxil-agarose (Fig.4.8A) e em epóxi-quitosana-alginato (Fig.4.8B).

Dentro da faixa estudada, não foi verificada a saturação dos suportes com o aumento do carregamento de proteína. A porcentagem de enzima não imobilizada foi inferior a 5% para todos os carregamentos empregados. Isto mostra que ambos os suportes permitem imobilizar alta concentração de proteína. A imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosa* em géis agarose-glutaraldeído e em epóxi-quitosana-alginato também permitiu imobilizar a mesma concentração de proteína no suporte (MENDES et al, 2008), mostrando que os resultados obtidos para a hidantoinase imobilizada nestes dois suportes estão de acordo com dados relatados na literatura.

A Figura 4.9 A/B mostra a relação entre o carregamento de proteína e a efetividade (η), relação entre a atividade aparente (observada) e a atividade na ausência de limitações difusionais (teórica) dos derivados de hidantoinase imobilizados em glioxil-agarose e em epóxi-quitosana-algintato. A velocidade intrínseca da reação aumenta com o aumento da carga enzimática, entretanto, a difusão do substrato nos interstícios do gel pode diminuir devido à redução do tamanho dos poros pela imobilização de moléculas de enzima (SALIS et al, 2003; RODRIGUES et al, 2008). Portanto, a efetividade do derivado diminui com o aumento da carga imobilizada.



Dentre os derivados obtidos, glioxil-agarose apresentou menor limitação difusional quando comparado aos derivados de epóxi-quitossana-alginato. Na Figura 4.9, verifica-se que carregamentos acima de 60 mg de proteína/gel em gel de epóxi-quitossana-alginato, a atividade recuperada se manteve constante, da ordem de 10% e para os derivados de agarose o aumento da carga de proteína aumentou o efeito de limitação difusional. Os diferentes perfis de limitação difusional para os distintos suportes podem ser explicados pela diferença na estrutura interna das matrizes. Gel de agarose possui poros de diâmetros maiores que o gel híbrido de epóxi-quitossana-alginato, por isso a limitação difusional do substrato aos poros de quitossana-alginato é maior, verificado pela efetividade dos derivados.

Diferentes trabalhos relatados na literatura mostram a influência do carregamento de proteína sobre a efetividade dos biocatalisadores (SALIS et al, 2003). A imobilização de lipases de *Candida antarctica* (CALB) e de *Thermomyces lanuginosa* (LTL) em resina hidrofóbica Accurel EP-100 também apresentou limitações difusionais em altos carregamentos sobre a hidrólise de tributirina (SALIS et al, 2003), mostrando que os nossos resultados estão de acordo com a literatura.

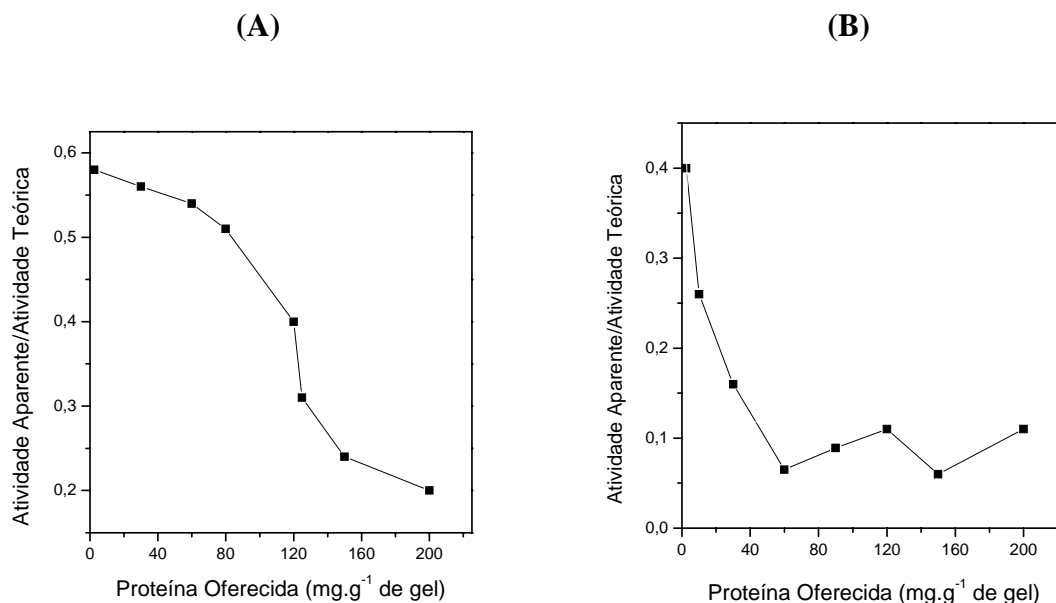


Figura 4.9 Influência do carregamento de proteína sobre a efetividade (relação entre a atividade aparente (observada) e a atividade na ausência de limitações difusionais (teórica) em géis glioxil-agarose (A) e epóxi-quitosana-alginato (B).

Os melhores derivados encontrados nesse trabalho, foram usados na reação de hidrólise de D,L- Fenilhidantoína, para a produção de N-Carbamoil-D-aminoácido.

4.6 Eletroforese da enzima livre

A Figura 4.10 mostra o gel de eletroforese da solução de D-Hidantoinase preparada como no item 3.2.20. Sabe-se que as D-Hidantoinases são enzimas que possuem massa molecular acima de 200 kDa e que todas as 4 subunidades possuem massas moleculares idênticas. Dessa forma, sob condições desnaturantes, pode-se ver no gel que há apenas uma banda com massa aproximada de 50kDa, o que muito provavelmente corresponda a uma subunidade. Verifica-se ainda pela análise a presença de algumas impurezas, porém todas em baixa concentração quando comparadas a D-Hidantoinase.

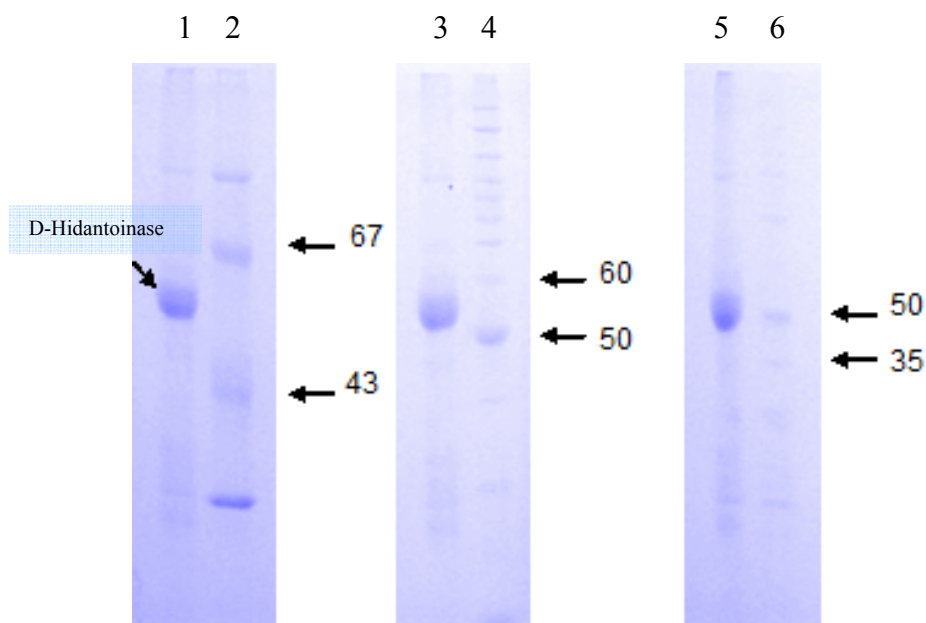


Figura 4.10. Eletroforese desnaturante da enzima livre. Linhas 1, 3 e 5: D-Hidantoinase; 2: Broad Range Protein Molecular Weight Markers – Promega; 4: Benchmark Protein Ladder – Invitrogen; 6: Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis - Amershan Pharmacia Biotech.

Park et al (1998) estudaram D-hidantoinase de *Bacillus thermocatenulatus* GH-2 e estimaram a massa molecular desta como sendo de 230kDa e através da massa molecular de uma subunidade foi assumido que a hidantoinase era composta por quatro subunidades idênticas.

4.7 Eletroforese da enzima imobilizada

Observa-se na Figura 4.11, que a enzima mesmo estando imobilizada quando colocada em condições desnaturantes desprende suas subunidades. Porém não dá para concluir qual das subunidades está se soltando. A enzima apesar de ser um tetrâmero, todos os monômeros são idênticos e possuem a mesma atividade, ou seja, não há necessidade de estarem unidos para desempenhar a atividade biológica (KISHAN et al, 2005). Portanto a imobilização da enzima não prejudica sua ação mesmo em condições que possam provocar o desprendimento de subunidades que não estejam ligadas covalentemente ao suporte.

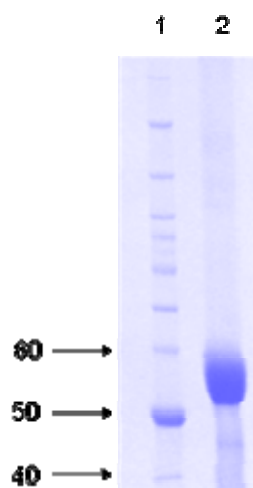


Figura 4.11. Eletroforese desnaturante da enzima imobilizada. Linha 1: padrão de massa molecular conhecida da Benchmark Protein Ladder – Invitrogen padrão de massa molecular; 2: 10 μ L de amostra, preparada com 20 mg de gel em 100 μ L de tampão de ruptura.

4.8 Desenvolvimento de Método Cromatográfico para Análise dos Enantiômeros D,L-Fenilglicina

Foram avaliadas diferentes colunas de antibiótico (T e TAG) por apresetarem propriedades físicas e moleculares favoráveis a separação de aminoácidos.

4.8.1 Avaliação da coluna T (Chirobiotic T 250 x 4,6 mm, 10 μ m Astec) para a separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina.

Para a separação da mistura racêmica do aminoácido Fenilglicina, utilizou-se a seguinte fase móvel: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{TEA}$ (100:1:1) com volume de injeção de amostra de 100 μ L. Decorridos 120 min de análise não houve eluição do composto de interesse, comprovando que o produto ficou retido na coluna, sendo necessário ajustes nas condições de separação.

Desta forma, com o objetivo de conseguir a separação dos enantiômeros, uma segunda fase móvel foi testada na coluna Chirobiotic T (250 x 4,6 mm) utilizando-se como eluente uma mistura de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30). Com esta nova fase móvel foi possível conseguir uma boa resolução enantiomérica, que pode ser observada na Figura 4.12.

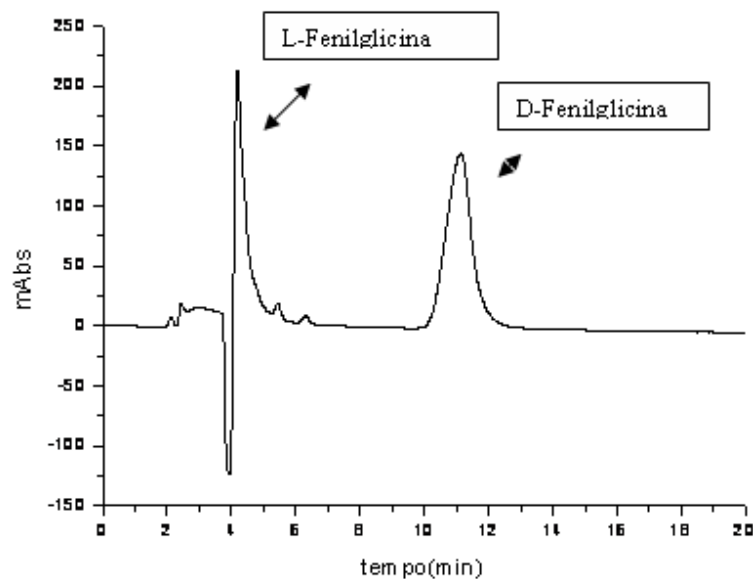
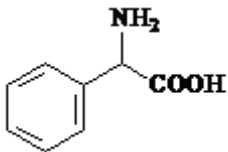


Figura 4.12. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min e $\lambda=210\text{nm}$.

Com o objetivo de aumentar o tempo de retenção da L-fenilglicina foram realizados alguns testes com diferentes combinações de fase móvel de acordo com os resultados descritos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Testes realizados na Coluna T com os parâmetros cromatográficos

 <i>D- Fenilglicina</i>	<i>Fase móvel</i> <i>MeOH/H₂O</i>	<i>k1</i>	<i>k2</i>	<i>α</i>	<i>Rs</i>
	(60:40)*	0,82	3,43	4,17	13,19
(50:50)*	1,06	3,77	3,56	1,85	
(30:70)*	1,63	4,09	2,51	2,43	
(100%) MeOH*	3,87	—	—	—	
(70:30)**	1,68	7,18	4,27	22,69	

* amostra solubilizada em água; ** amostra solubilizada na fase móvel

O cromatograma a seguir mostra a melhor condição encontrada para a separação dos enantiômeros estudados, no qual a amostra de aminoácidos foi solubilizada na fase móvel (Figura 4.13), justificando a mudança no tempo de retenção do primeiro composto eluído.

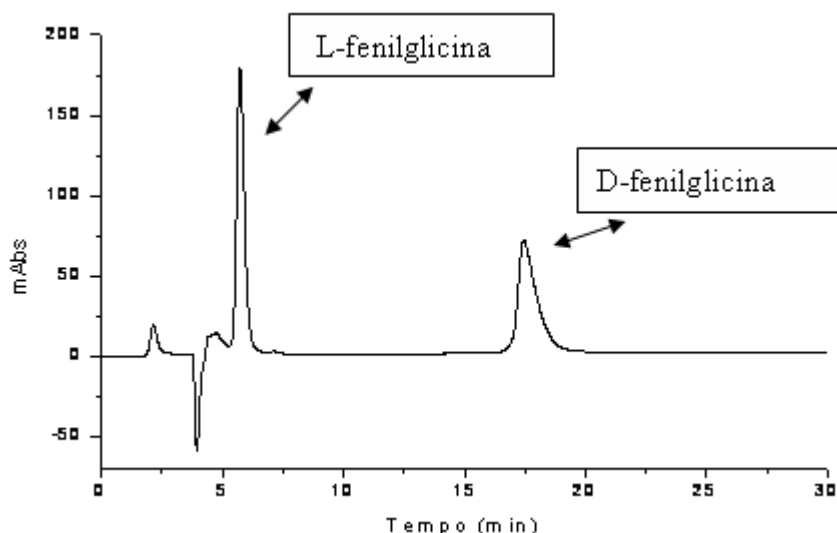


Figura 4.13. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel.

As colunas de Teicoplanina e TAG são muito semelhantes estruturalmente. A TAG possui um grupo “aglycon” que a difere da teicoplanina, conferindo a esta, propriedades diferentes o que poderia proporcionar uma melhor separação dos aminoácidos de interesse neste estudo.

4.8.2 Avaliação da coluna TAG (Chirobiotic TAG 250 x 4,6 mm, 10 μm Astec) para a separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina.

Para o início dos estudos de condição de separação enantiomérica da D,L-fenilglicina com a coluna Teicoplanina aglycon (TAG), utilizou-se a melhor condição apresentada pela coluna T. De acordo com a Figura 4.14, observa-se a eluição dos enantiômeros com alargamento da banda referente a D-fenilglicina comprometendo o cromatograma, indicando uma forte interação do analito com a coluna cromatográfica.

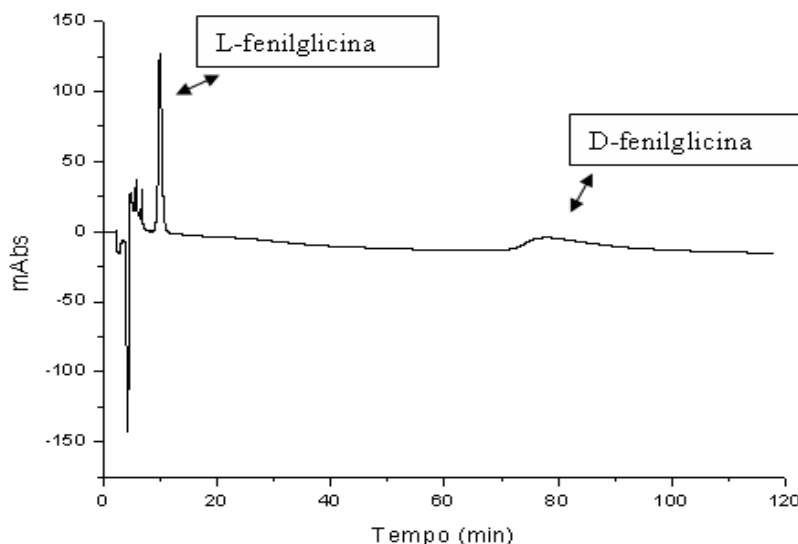
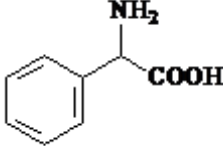


Figura 4.14 . Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic TAG (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min e $\lambda=210\text{nm}$.

Com o objetivo de diminuir essa interação, a proporção do modificador orgânico foi alterado para 40%, esperando com isso, que houvesse uma maior interação do aminoácido com a fase móvel e redução do tempo de retenção. Os resultados estão representados na Tabela 4.8. e o melhor cromatograma apresentado na Figura 4.15.

Tabela 4.8. Testes realizados na Coluna TAG com os parâmetros cromatográficos

 <i>D- Fenilglicina</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>k1</i>	<i>k2</i>	<i>α</i>	<i>Rs</i>
	<i>MeOH/H₂O</i>				
	(70:30)**	3,25	38,15	11,74	2,36
	(40:60)**	1,14	11,71	10,25	4,23

** amostra solubilizada na fase móvel

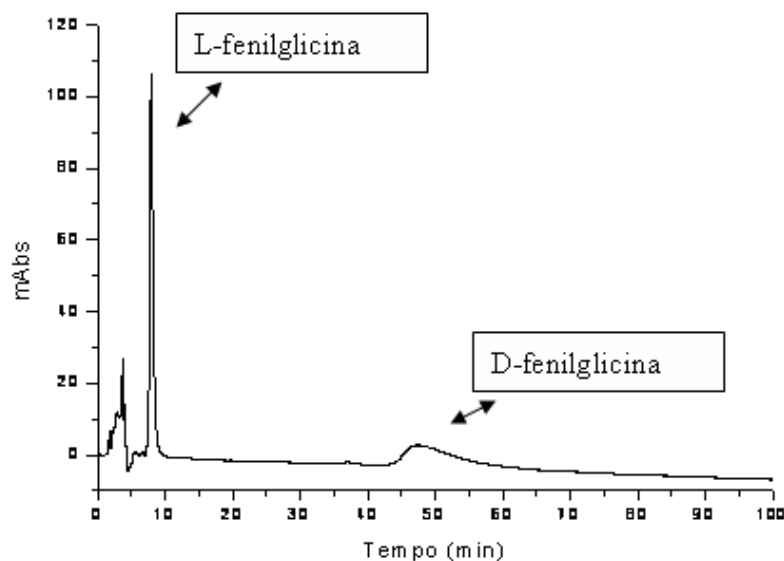


Figura 4.15. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D-L-Fenilglicina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic TAG (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (40:60), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel.

4.8.3 Avaliação do desempenho das colunas de antibiótico na separação dos enantiômeros da D,L- fenilglicina.

De acordo como os resultados obtidos, observou-se que os fatores de retenção para os enantiômeros D,L-fenilglicina diferem consideravelmente nas duas fases estacionárias em nosso estudo, por ser a polaridade diferente nas duas colunas.

Devido a sua estrutura química, a coluna T foi a mais indicada para a separação de aminoácidos por apresentar melhores parâmetros cromatográficos (ARMSTRONG et al, 1994; WARD e FARRIS, 2001; BERTHOD et al, 2002; ABOUIL-ENEIN et al, 2002).

O aumento do fator de retenção com o aumento do metanol (modificador orgânico) na fase estacionária de teicoplanina foi devido à diminuição da solubilidade do aminoácido polar na fase rica em metanol. Muitos aminoácidos são mais solúveis em água do que no modificador orgânico e o tempo de retenção desses aminoácidos diminui com o aumento da quantidade de água (LO et al, 2003). Na coluna TAG, o tempo de retenção diminui com o aumento da concentração de água, pois se aumenta as interações hidrofílicas entre os aminoácidos e a fase móvel rica em água. O mesmo desempenho foi observado no estudo de aminoácidos secundários de PÉTER et al, (2004).

A interação entre o segundo enantiômero eluído e a fase estacionária é mais forte, nas duas colunas, produzindo altos fatores de retenção, principalmente na TAG, e menor adsorção cinética, o que resulta em baixas transferências de massas (ÁRKI et al, 2004).

Observa-se nas Figuras 4.14 e 4.15 que o fator de retenção de D-fenilglicina, para a coluna TAG, aumentou com o aumento da concentração do solvente orgânico na fase móvel e o fator de retenção da L-fenilglicina foi pouco afetado pela composição da fase móvel, ou seja, a seletividade quiral para fenilglicina aumentou com o aumento da concentração do metanol. Os mesmos resultados foram observados por Jandera e colaboradores (2001).

Estudos prévios indicam que a coluna Chirobiotic TAG tem capacidade de separar na fase reversa com menor concentração de solvente orgânico (BERTHOD et al, 2002; BECHTOLD et al, 2006). Com o aumento da concentração de álcool na fase móvel, a retenção do enantiômero D aumenta, enquanto a retenção do enantiômero L foi pouco afetada.

Conclui-se que para a separação dos enantiômeros D,L-fenilglicina, a coluna que apresentou os melhores parâmetros de separação foi a Chirobiotic T (Tabela 4.7).

4.9 Desenvolvimento de Método Cromatográfico para Análise dos enantiômeros D,L-Fenilhidantoína

Segundo Arcuri et al (2003), fenilhidantoína é o melhor substrato para a produção de N-Carbamoil-D-aminoácido. Desta forma, a mesma metodologia estabelecida para a separação dos enantiômeros da D,L-Fenilglicina (precursor para a síntese de fenilhidantoína), foi usada para separar os enantiômeros D,L-fenilhidantoína. A figura 4.16, a seguir mostra a melhor resolução encontrada para a separação dos enantiômeros da D,L-fenilhidantoína.

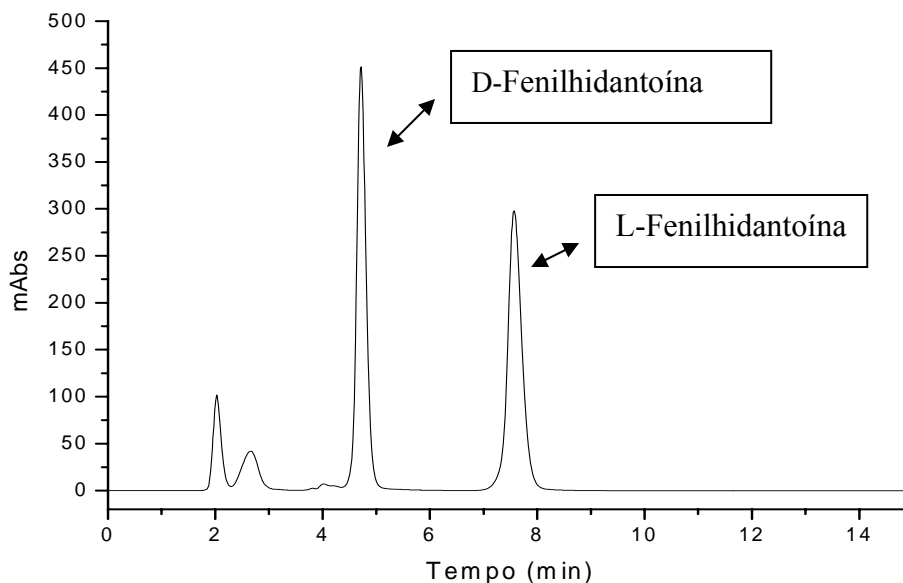


Figura 4.16. Cromatograma de separação da mistura racêmica de D,L-fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$ e amostra solubilizada na fase móvel.

4.10 Reação de Hidrólise da Fenilhidantoína para a Produção do N-Carbamoil-D-Fenilglicina

A hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoína gera o N-Carbamoil-D-Fenilglicina; esta reação foi feita com a enzima livre e imobilizada, sendo monitorada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna C-18, acompanhando-se a formação do produto e analisando-se a cinética reacional. O produto formado (N-carbamoil-D-fenilglicina) foi caracterizado e identificado por meio da análise de seu espectro de infravermelho (IV), e a estereosseletividade da enzima foi confirmada com análise cromatográfica, utilizando-se um detector de dicroísmo circular, confirmando a formação do produto D, descartando-se inclusive a possibilidade de racemização do produto formado.

4.10.1 Hidrólise da Fenilhidantoína pela Enzima Livre

A hidrólise foi feita como descrita no item 3.2.22. As amostras extraídas a cada hora foram analisadas na coluna C-18, para se traçar a cinética reacional de formação do produto desejado. A reação foi monitorada por 24 horas, porém, em 3 horas de reação todo substrato já havia sido convertido em produto. A Figura 4.17, abaixo ilustra o curso reacional da hidrólise com consumo do substrato e formação do produto.

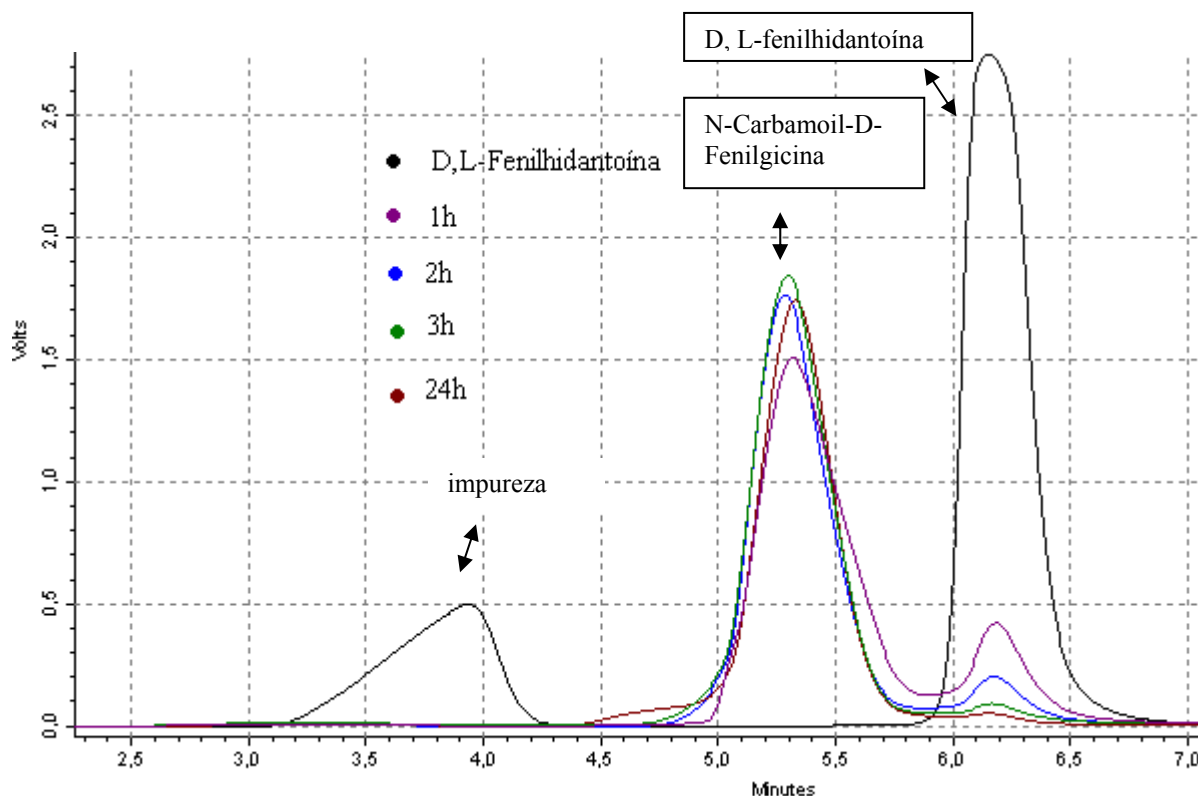


Figura 4.17. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise da mistura racêmica de D,L-Fenilhidantoína catalisada pela enzima livre. Condições cromatográficas: Coluna: C-18 (3,9x300 mm, 10 μ m, Waters), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, λ =210nm.

A mesma condição de reação de hidrólise usada para enzima livre foi empregada na enzima imobilizada para verificar se houve perda da atividade catalítica da enzima quando imobilizada.

4.10.2 Hidrólise de D,L- Fenilhidantoína pela Enzima Imobilizada em Glioxil-agarose 6BCL

O derivado selecionado para a hidrólise de D,L-Fenilhidantoína foi o que apresentou os melhores parâmetros de imobilização, ou seja, 100% de rendimento, estabilidade de 89 vezes e atividade recuperada de 58%, D-hidantoinase imobilizada em glioxil-agarose por 24h a pH 10,05 (25°C) e redução com borohidreto de sódio (1mg/mL) na presença de 10mM de Zn²⁺. Praticamente o mesmo perfil observado na hidrólise da enzima livre foi visto na enzima imobilizada aqui estudada. Os resultados estão mostrados na Figura 4.18.

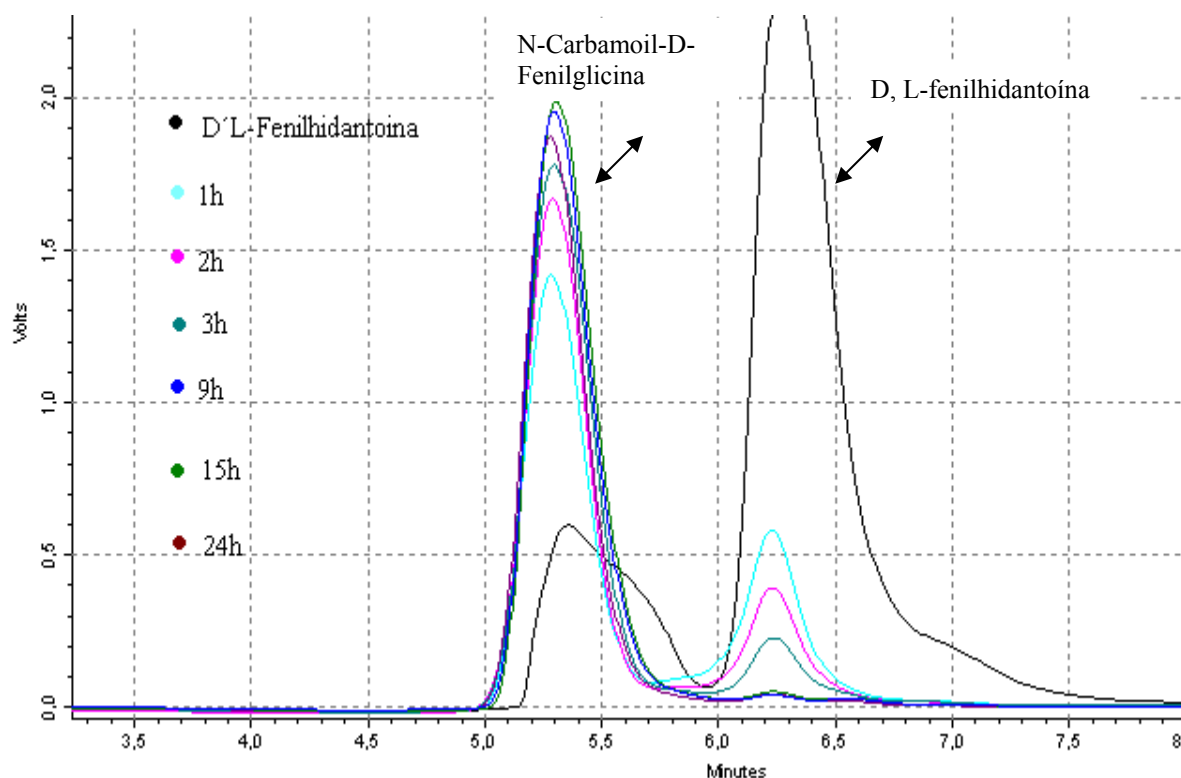


Figura 4.18. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glicil-agarose da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: C-18 (3,9x300 mm, 10 μ m, Waters), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, λ =210nm.

Conforme observado nos cromatogramas acima, a hidrólise da mistura da D,L-fenilhidantoína com a enzima imobilizada em glicil-agarose 6BCL, apresentou o mesmo perfil em comparação a enzima livre, porém, com um tempo maior de reação devido a limitação difusional, uma barreira para o substrato, promovida pelo suporte. O tempo necessário para converter todo o substrato foi 3 vezes maior do que na enzima livre. Entretanto a seletividade da enzima foi a mesma para ambas as formas da enzima.

Após confirmação da produção do N-carbamoil-D-fenilglicina, as alíquotas retiradas no decorrer da hidrólise foram injetadas em uma coluna quiral, para se avaliar a estereosseletividade da enzima. A Figura 4.19, ilustra a formação do produto desejado e o consumo preferencial do D-enantiômero pela enzima. Outra importante observação é a interconversão do L-enantiômero em D (racemização), o que contribuiu para a formação do produto desejado.

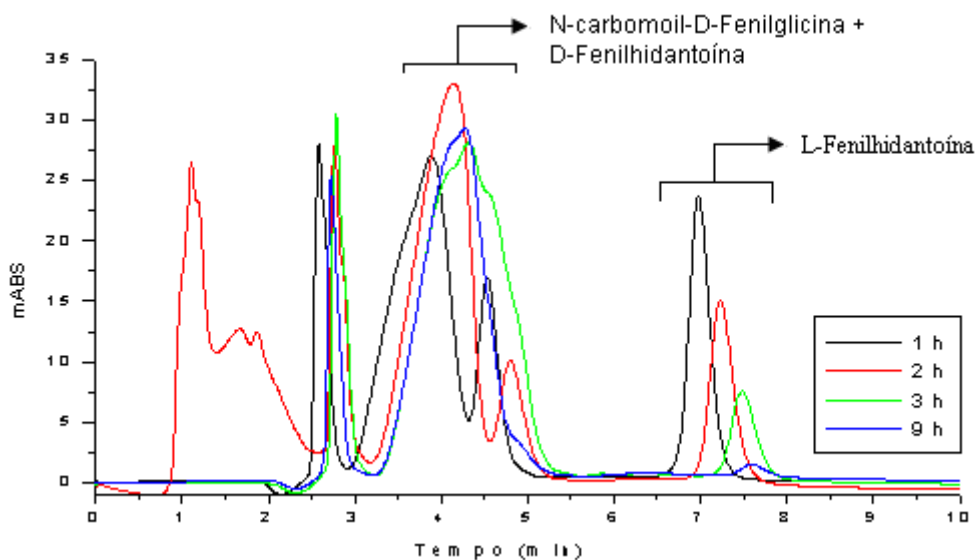


Figura 4.19. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glicil-agarose da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

Para uma melhor visualização dos cromatogramas e resultados, os cromatogramas foram separados, como se observa na Figura 4.20.

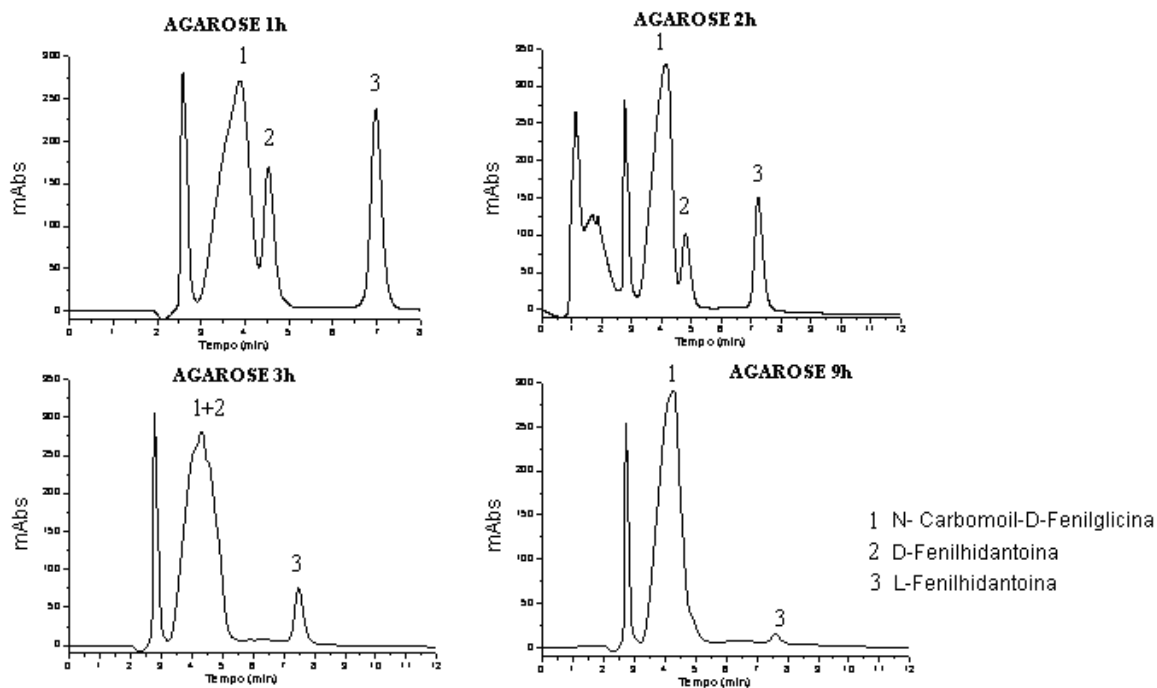


Figura 4.20. Separação dos cromatogramas nos tempos de hidrólise realizada pela enzima imobilizada em glicil-agarose da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

Como efeito de comparação, a hidrólise também foi realizada com a enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato.

4.10.3 Hidrólise de D,L-Fenilhidantoína catalisada pela enzima imobilizada em Quitosana-Alginato-Epoxilada.

Com o emprego do suporte quitosana, o melhor resultado obtido foi com o suporte modificado quimicamente, quitosana - alginato - epoxilada. As mesmas condições de hidrólise com a enzima livre foram empregadas para a enzima imobilizada em quitosana – alginato - epoxilada. As alíquotas reacionais foram analisadas por cromatografia líquida, conforme observado na Figura 4.21.

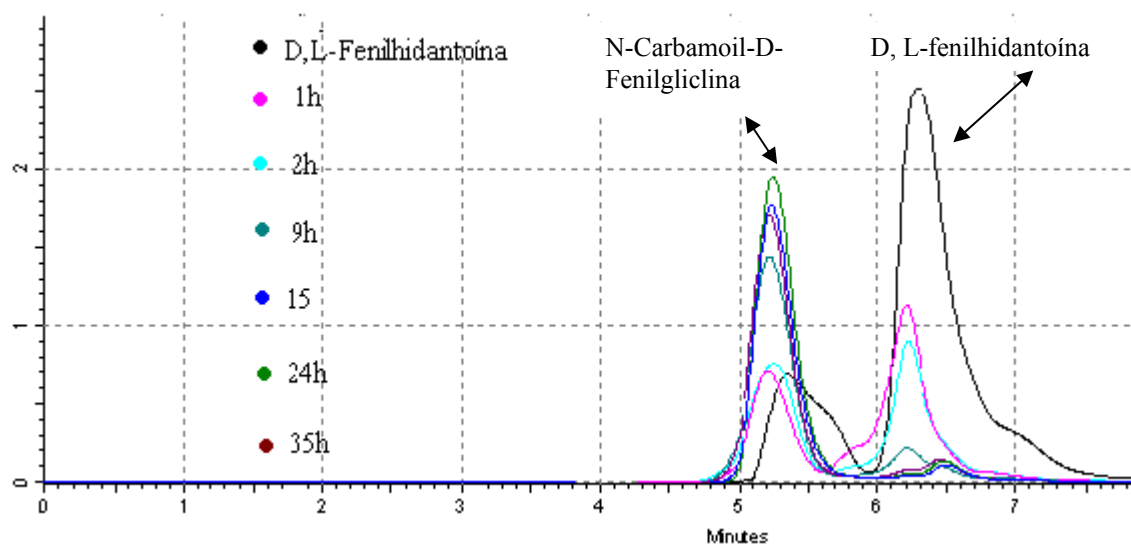


Figura 4.21. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise da mistura racêmica catalisada pela enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: C-18 (3,9x300 mm, 10 μ m, Waters), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, λ =210nm.

Observa-se na Figura 4.21 a formação do produto desejado, porém quando comparado com a enzima livre, a reação para conversão de praticamente 99% do substrato em produto leva um tempo muito maior, de quase 24 h, mas as análises em coluna quiral comprovam que a seletividade da enzima é mantida mesmo mediante imobilização, como observado na Figura 4.22.

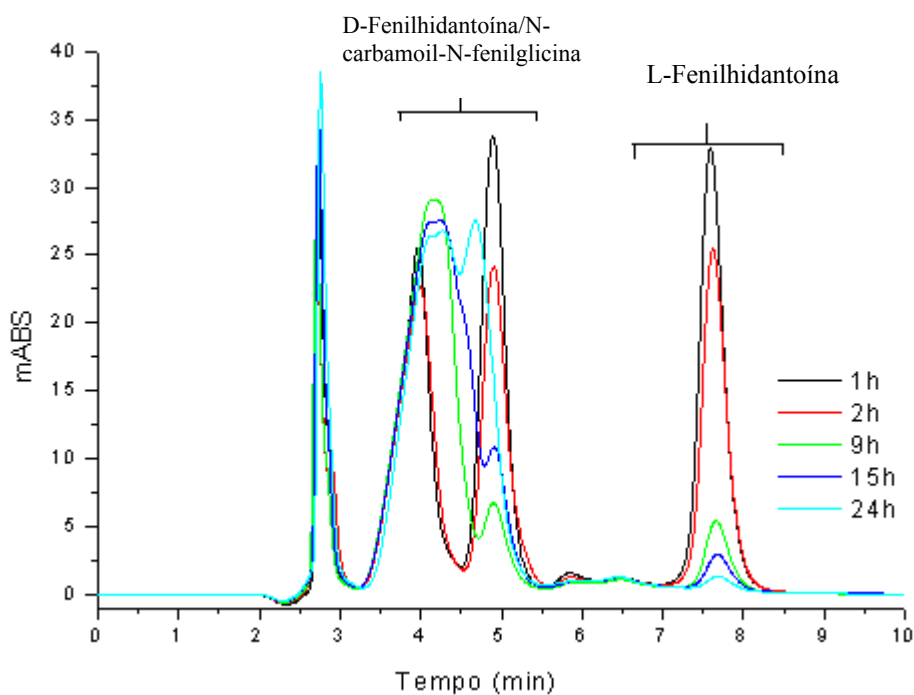


Figura 4.22. Cromatograma de análise da formação do N-Carbamoil-D-fenilglicina a partir da hidrólise realizada pela enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

Para uma melhor visualização dos cromatogramas, esses foram separados como na Figura 4.23.

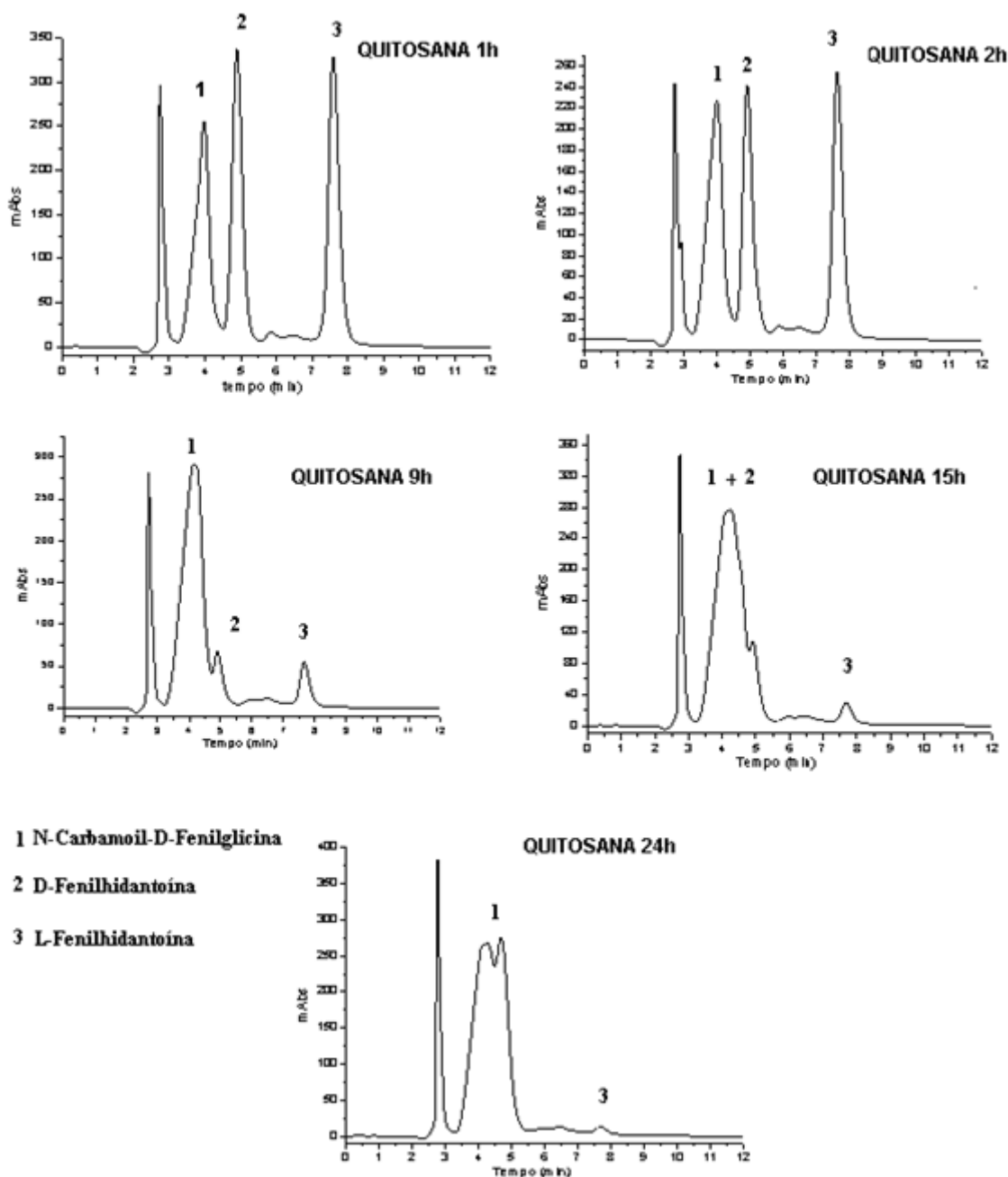


Figura 4.23. Separação dos cromatogramas nos tempos de hidrólise realizada pela enzima imobilizada em quitosana-alginato-epoxilada da mistura racêmica de D-L-Fenilhidantoina. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

4.10.4 Cinética Reacional e Seletividade da Enzima na Hidrólise da D-L-Fenilhidantoina com a Enzima Livre e Imobilizada

A enzima D-Hidantoinase vêm sendo usada na forma imobilizada de diversas maneiras para a produção de N-Carbamoil. Lee et al, 1996, reportaram o uso de D-

hidantoinase de *Bacillus* adsorvida em DEAE-celulose para a produção de Carbamoil-fenilglicina, mas os valores de conversão não foram relatados.

Raí e Taneja, 1998, imobilizaram a D-hidantoinase de lentil em DEAE-celulose também para ser usada na produção de Carbamoil e obtiveram uma taxa de conversão de 70-85%. Outros autores como Arcuri et al (2004) imobilizaram D-hidantoinase de *Vigna angularis* via ligação covalente em aminopropil e relataram taxa de conversão de 98%. Yin et al (2000), usou células recombinantes de *Escherichia coli* expressando D-hidantoinase para catalisar a produção de N-carbamoil-D-hidroxifenilhidantoina de D,L-hidroxifenilhidantoina. Neste estudo, o efeito da imobilização aumentou o tempo reacional, porém a seletividade da enzima foi mantida.

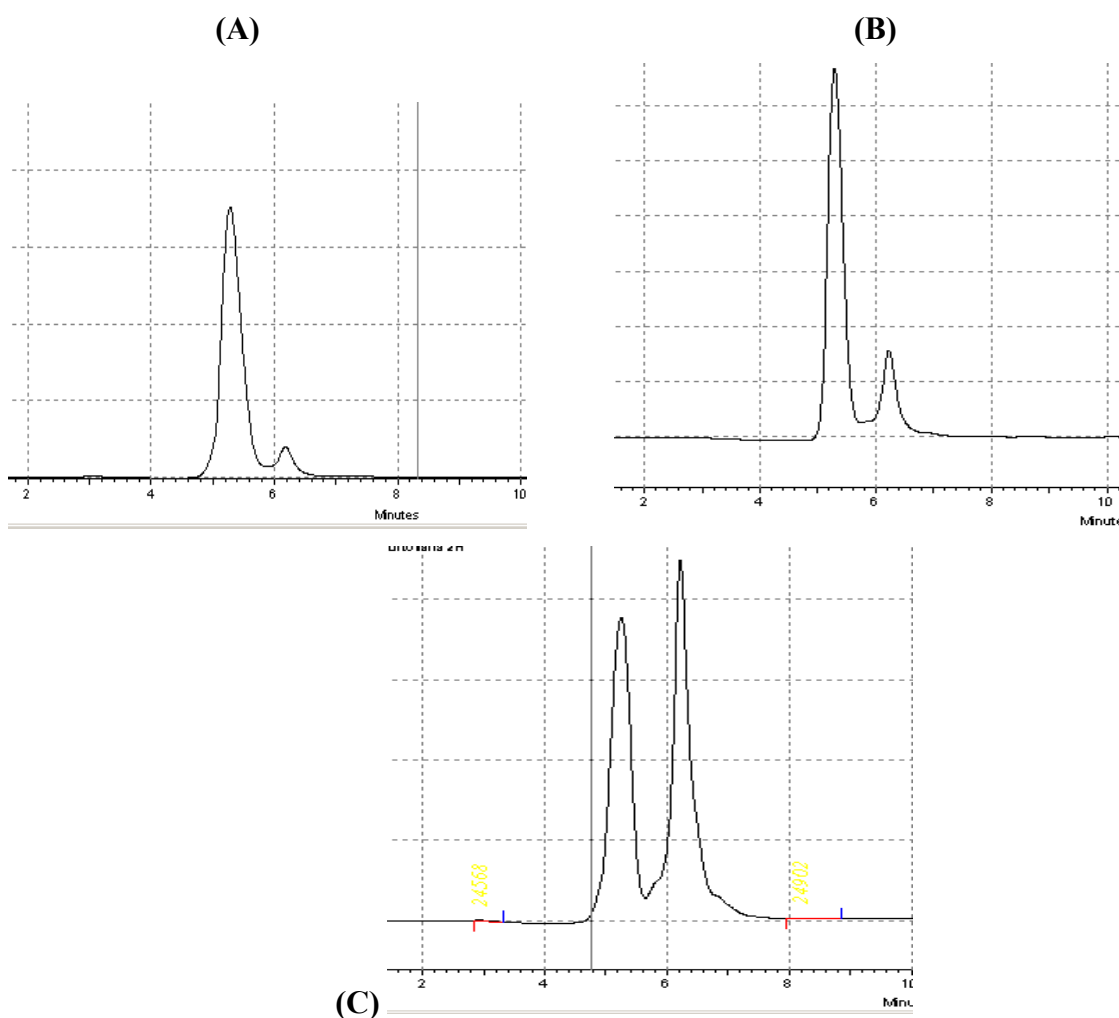


Figura 4.24. Cromatogramas ilustrativos da comparação da cinética reacional da hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoina com 2 horas de reação para a enzima livre (A); imobilizada em agarose (B) e imobilizada em quitosana (C).

De acordo com a análise dos cromatogramas da Figura 4.24, observa-se que a reação com a enzima livre em 2 horas apresentou conversão superior a 90%, já para as

hidrólises com a enzima imobilizada, no mesmo tempo de reação, as conversões foram menores, sendo de 80% para a enzima imobilizada em glioxil-agarose e de 45% com a enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato. Porém, a seletividade da enzima foi mantida em todos os casos, comprovando-se a preferência da enzima pelo enantiômero D, sem a formação de subprodutos L.

A tabela a seguir mostra os resultados de estereosseletividade da enzima, com total conversão do substrato no produto com a estereoquímica desejada – N-carbamoil-D-fenilglicina.

Tabela 4.9. Resultados de seletividade da enzima D-Hidantoinase na hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoína e formação preferencial do produto N-carbamoil-D-fenilglicina.

ENZIMA	TEMPO REACIONAL (H)	SELETIVIDADE ENZIMÁTICA - CONVERSÃO EM PRODUTO (% EM MASSA)
Livre	3	99,95
Imobilizada em Agarose	9	99,91
Imobilizada em Quitosana	15	99,89

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.9, observa-se que, embora os tempos reacionais sejam bastante diferenciados, em todos os casos a conversão em produto foi superior a 99%, comprovando-se que a estereosseletividade da enzima pelo enantiômero D foi mantida.

4.11 Estudo da Racemização dos Enantiômeros da D,L-Fenilhidantoína

Segundo Park et al (2002), a taxa de racemização de hidantoínas em pHs alcalinos é muito maior do que em pHs neutros. O processo de racemização é definido como a transformação de uma substância opticamente ativa na forma racêmica inativa. No caso das hidantoínas, o enantiômero L se interconverteria para a forma D. A taxa de conversão de L-hidantoínas é frequentemente observada em temperaturas mais altas, favorecendo a produtividade já que nessas condições a solubilidade do substrato também é aumentada (LEE et al, 1997).

Para verificar a ocorrência de racemização nas condições de hidrólise estudadas (0,1 M de tampão borato/KCl - pH 9,0 - 20 mM de fenilhidantoína), foi realizada a hidrólise de L-fenilhidantoína, nas condições descritas no item 3.2.22., onde observou-se que, ao solubilizar a fenilhidantoína no meio reacional ainda na ausência de enzima,

constatou-se a interconversão do L-enantiômero para a forma D conforme observado na Figura 4.25, representado no gráfico pela linha L-nicial. Garcia e Azerad (1997), observaram que a racemização enantiomérica de derivados de fenilhidantoína, forma L para a forma D, ocorre especialmente em condições de pH maior ou igual a 8.

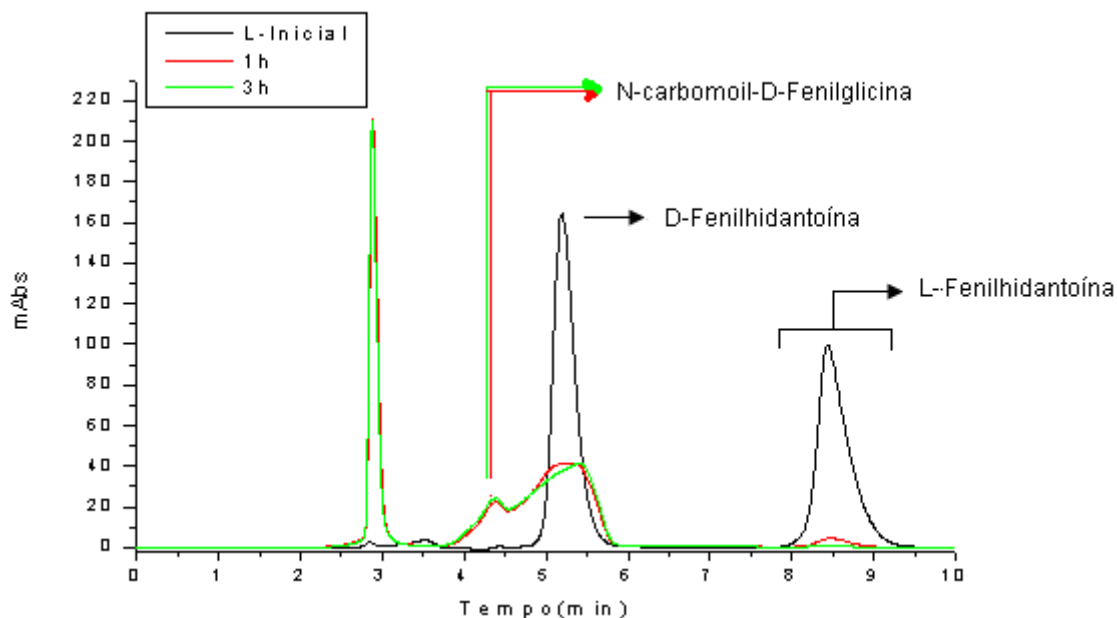


Figura 4.25. Cromatograma de Racemização da forma enantiomérica L para a forma D. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

Uma vez que a forma L é racemizada para a forma D a sua rápida racemização desloca o equilíbrio químico para a formação do produto. Trabalhar com a mistura enantiomérica na indústria é mais interessante, pois a porcentagem de produto obtida será maior devido à racemização das formas enantioméricas sendo possível a conversão de 100% para o produto de interesse. Outro benefício é que não exige o uso de substratos enantiomericamente puros que são difíceis de serem obtidos. (LEE e KIM, 1998; BURTON e DORRINGTON, 2004).

4.12 Caracterização do N-Carbamoil-D-Fenilglicina por análise de seu Espectro na Região do Infravermelho

Após a extração e secagem do produto formado na reação de hidrólise da mistura D,L-fenilhidantoína, foi feita a análise do N-carbamoil-D-fenilglicina empregando-se a técnica do infravermelho.

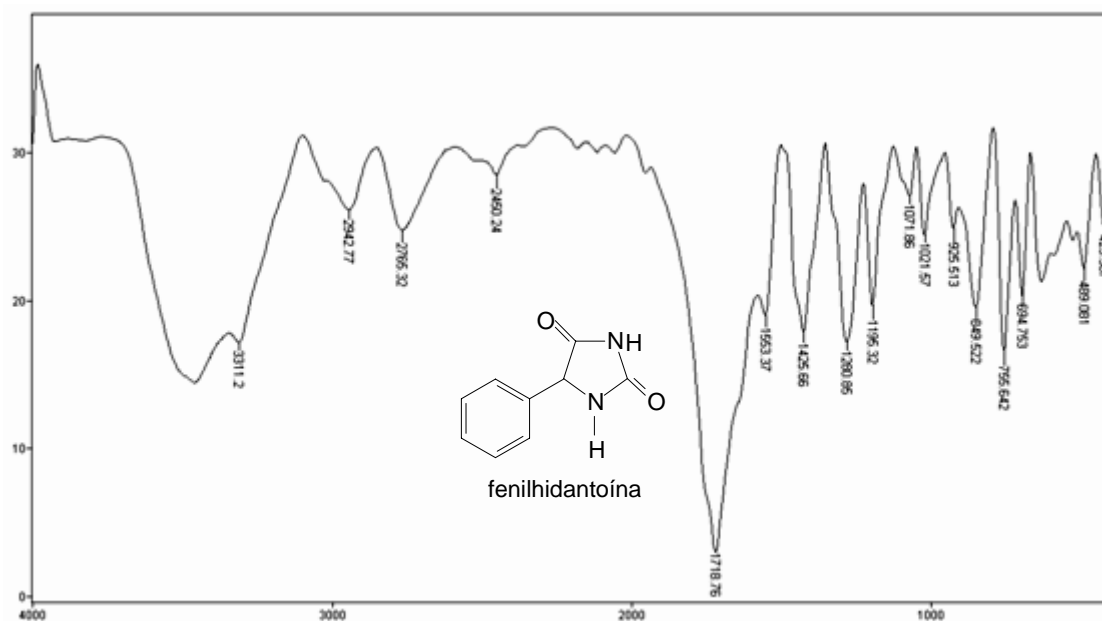


Figura 4.26. Espectro na região do infravermelho da mistura D,L-fenilhidantoína.

Inicialmente foi feita a análise do substrato D,L-fenilhidantoína (Figura 4.26), onde observa-se a presença de uma banda intensa em 1718 cm^{-1} , referente a deformação axial da ligação C=O característica de lactamas (amidas cíclicas de 5 membros), ligação esta existente no anel hidantoínico. Observa-se também uma banda larga e intensa em 3311 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação N-H de amidas primárias cíclicas, além de uma banda em 755 cm^{-1} da deformação angular da ligação N-H.

Em seguida, analisou-se o espectro do produto formando, comprovando-se a obtenção do N-carbamoil-fenilglicina desejado, cujo espectro está ilustrado na Figura 4.27.

Através da análise do espectro na região do infravermelho do N-carbamoil-fenilglicina formado a partir da hidrólise da fenilhidantoína, observa-se o aparecimento de uma banda em 1615 cm^{-1} , referente a deformação axial assimétrica da carbonila do grupo carboxila livre C=O, comprovando-se a hidrólise da ligação amida, com abertura do anel hidantoínico, além da presença de uma banda larga em 3145 cm^{-1} , referente a deformação axial da ligação O-H do grupo carboxila livre, o que caracteriza como sendo a formação do produto desejado.

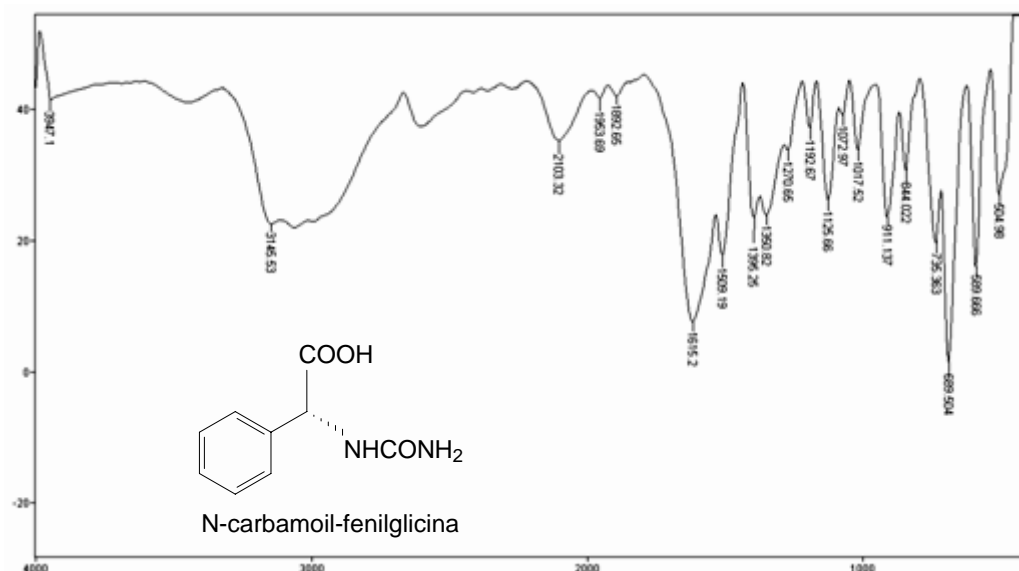


Figura 4.27. Espectro na região do infravermelho do N-carbamoil-fenilglicina.

4.13 Verificação da Estereosseletividade da Enzima D-Hidantoinase na Reação de Hidrólise da D,L-Fenilhidantoína

Na reação de hidrólise foi demonstrada a estereosseletividade da enzima pelo enantiômero D pelas análises cromatográficas com detector de dicroísmo. O cromatograma apresenta uma deflexão positiva, sugerindo que ao final da hidrólise havia somente N-Carbamoil-D-fenilglicina.

Pelo cromatograma pode-se observar que não ocorre a racemização do produto ao final da reação.

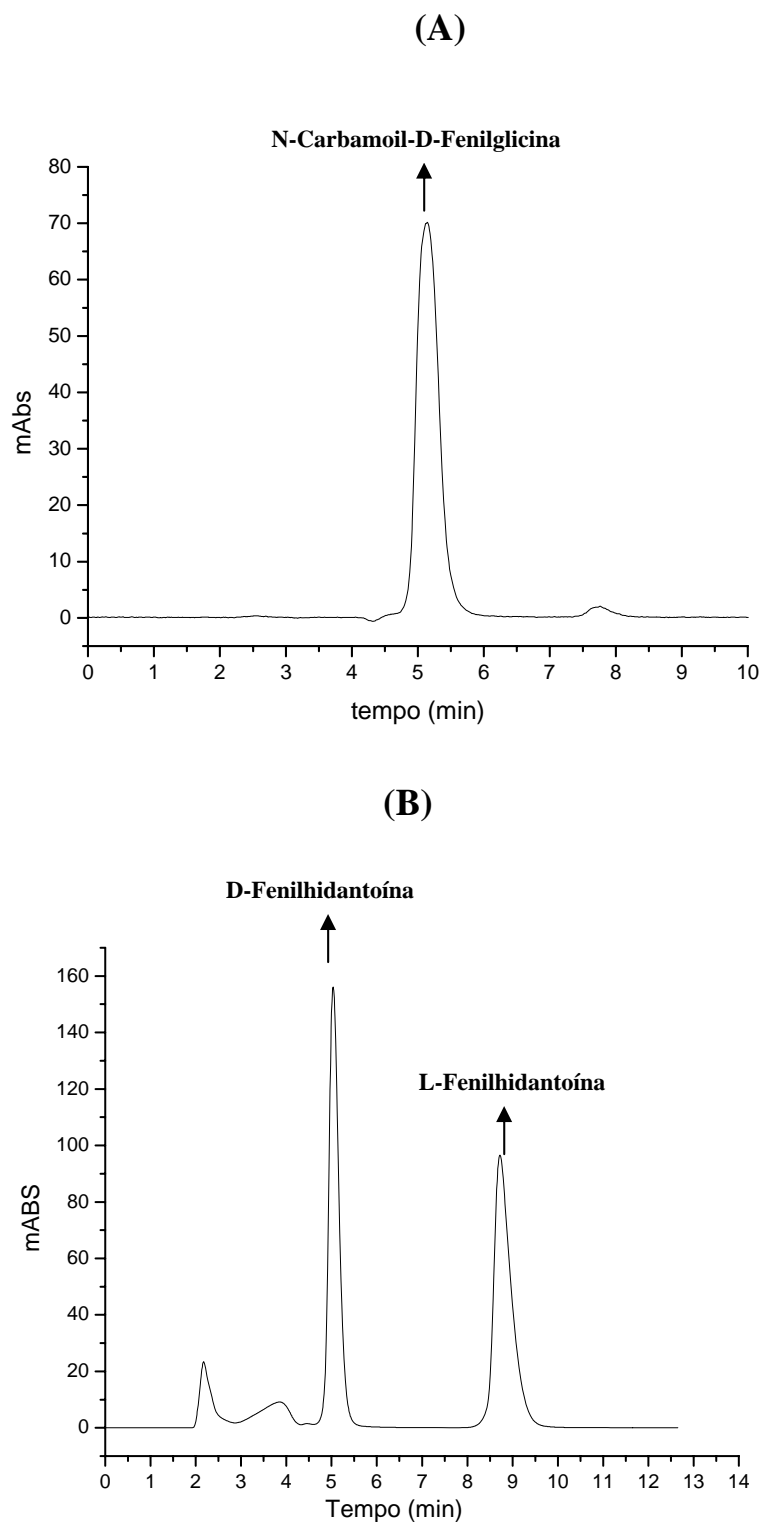


Figura 4.28. (A) Cromatograma do produto formado na reação de hidrólise e, (B) Cromatograma de separação da D,L-Fenilhidantoína. Condições cromatográficas: Coluna: Chirobiotic T (250 x 4,6 mm), fase móvel: CH₃OH/H₂O (70:30), vazão: 0,5 mL/min, $\lambda=210\text{nm}$.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de derivados ativos e estabilizados termicamente de D-hidantoinase imobilizados por ligação covalente multipontual nos suportes orgânicos quitosana e agarose ativados por diferentes protocolos em reações de obtenção da N-carbamoil-D-fenilglicina, um intermediário da D-fenilglicina empregado como cadeia lateral na síntese de antibióticos. O enfoque foi baseado no uso de preparação de D-hidantoinase disponível comercialmente. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados destacam-se:

- A suplementação de íons bivalentes Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} durante a etapa de redução com borohidreto de sódio foi importante para o aumento da estabilização térmica dos derivados. O íon que mais protegeu o sítio ativo da enzima, aumentando a sua estabilidade, foi o íon Zn^{2+} . A adição de ácido hidantóico, também protegeu o sítio catalítico da enzima durante a etapa de obtenção do derivado no tempo de imobilização de 3h, mas com o aumento do tempo de imobilização foi verificada perda na estabilidade térmica da enzima, decorrente da possível interação deste ácido com o sítio ativo da enzima.
- A enzima D-hidantoinase é formada por 4 subunidades, segundo a literatura, e de acordo com os testes de estabilização térmica, não foi verificado um grande incremento sobre a sua estabilização. O aumento de estabilidade obtido foi inferior ao esperado para o percentual de lisinas imobilizadas, resultado este mostrado na análise de aminoácido que comprovou a ocorrência de ligações covalentes pela diminuição dos aminoácidos lisina.
- Com o intuito de aumentar a estabilidade térmica deste derivado, foi empregada a técnica de entrecruzamento da enzima com povidona após a imobilização. De acordo com os resultados obtidos, após o entrecruzamento, foi verificada total inativação do derivado reduzido e não-reduzido com $NaBH_4$. Possivelmente, o entrecruzamento com a povidona promoveu a interação de seus grupos aldeído com os grupos lisina presentes no sítio ativo da enzima. Em suma, o entrecruzamento de derivados de D-hidantoinase com povidona não foi uma boa alternativa para a estabilização do derivado.

- O melhor derivado obtido, imobilizado em glioxil-agarose por 24 h e reduzido na presença de íons Zn^{2+} , foi 89 vezes mais estável que a enzima solúvel. Para a mesma enzima imobilizada em epóxi-quitosana-alginato, o fator de estabilidade foi de aproximadamente 20, ou seja, em torno de 3 vezes menor que para o derivado imobilizado em glioxil-agarose. Derivados de agarose apresentaram maiores valores de atividade recuperada em comparação aos derivados imobilizados em epóxi-quitosana-alginato. Estes resultados podem ser explicados pela elevada porosidade da agarose e a geometria favorável ao processo de imobilização/estabilização. No caso da quitosana, a baixa porosidade da matriz pode ter influenciado negativamente no processo imobilização/estabilização da enzima.

- Os suportes glioxil-agarose e epóxi-quitosana-alginato mostraram similar capacidade de imobilização da enzima. Variando a concentração de enzima de 2,5 a 200 mg/g de gel, foi observada total imobilização da proteína oferecida para ambos os suportes dentro da faixa avaliada. No entanto, maiores efeitos difusivos foram observados para os derivados de epóxi-quitosana-alginato, por se tratar de uma matriz com menor volume de poros. Em suma, a natureza do suporte não influenciou sobre a porcentagem de enzima imobilizada, somente na atividade hidrolítica dos derivados.

- A eletroforese da enzima livre mostrou que a D-Hidantoinase tem subunidades com massa molecular acima de 50kDa. Na eletroforese da enzima imobilizada verificou-se o aparecimento de bandas correspondentes à massa molecular de uma subunidade da enzima, mostrando que mesmo imobilizada, a incubação em condições desnaturantes promove o despreendimento de subunidades, porém este fato não interfere na atividade hidrolítica da enzima.

- Nas condições de hidrólise testadas foi observada a racemização do enantiômero L da fenilhidantoína, para a forma D, forma na qual a enzima é seletiva, aumentando a conversão para o produto desejado, N-Carbamoil-D-fenilglicina. A enzima solúvel em 3 h de reação converteu todo o substrato, enquanto que para a enzima imobilizada em glioxil-agarose e epóxi-quitosana-alginato a máxima conversão foi obtida em 9 e 15 h, respectivamente. Mesmo

após o processo de imobilização, não foi constatada perda da enantiosseletividade.

- O produto das reações de hidrólise foi caracterizado pela análise de infravermelho que comprovou a hidrólise da ligação amida e abertura do anel lactâmico.

- Há estereosseletividade da enzima pelo enantiômero D demonstrado pelas análises cromatográficas com detector de dicroísmo que no final da hidrólise mostrou somente o N-Carbamoil-D-fenilglicina, não havendo racemização do produto durante a reação.

6 SUGESTÕES

- Imobilizar a D-Hidantoinase nas condições padrões de imobilização e na redução usando dois ou mais íons.
- Imobilizar a D-Hidantoinase com géis agarose ativados com glutaraldeído em pH 7,0, para verificar o efeito do pH na imobilização.
- Verificar se o Ácido Hidantóico é inativante da enzima.
- Testar diferentes tamanhos de dextranas, variando também a concentração, em diferentes tipos de imobilização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENDROTH, J.; NIEFIND, K.; SCHOMBURG, D. X-ray structure of a dihydropyrimidinase from *Thermus* sp. At 1.3Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, p. 143-156, 2002.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. **II Farmaco**, v.57, p. 513-529, 2002.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, Y. Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chomatographia**, v.52, p. 679-691, 2000.

ADRIANO, W.S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170-2179, 2008.

ADRIANO, W.S. Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. 25 de abril de 2008. 161f. **Tese de Doutorado em Engenharia Química**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

ALONSO, N. et al. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, p. 57-61, 2005.

ALTENBUCHNER, J.M.; SIEMANN-HERZBERG, C.; SYLDATK. C.O. Hydantoinses and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. **Current in Opinion Biotechnology**, v.12, p. 559-563, 2001.

ALTUN, G.D.; CETINUS, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 100, p. 964-971, 2007

ALVARO, G. et al. Immobilization–stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 210–214, 1990.

ANOVA, C. M.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 797, p. 91-109, 2003.

ARANAZ, I. et al. Co-immobilization of D-hydantoinase and D-carboamylase on chitin: Application to the Synthesis of p-Hydroxyphenylglycine. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21, p. 349-356, 2003.

ARCURI, M.B. et al. Kinetic study and production of N-carbamoyl-D-phenylglycine by immobilized D-hydantoinase from *Vigna angularis*. **Catalysis Letters**, v.79, p.1-4, 2002.

ARCURI, M.B. et al. On the mechanism of hydrolysis of hydantoins by D-hydantoinase from *Vigna angularis*: inhibition studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, p. 107-111, 2003.

ARCURI, M.B. et al. Resolution of DL-hydantoins by D-hydantoinase from *Vigna angularis*: Production of highly enantioenriched N-carbamoyl-D-phenylglycine at 100% conversion. **Amino Acids**, v.19, p. 477-482, 2000.

ARCURI, M.B. Stability of immobilized D-hydantoinase from *Vigna angularis* and repeated cycles of highly enantioenriched production of N-carbamoyl-D-phenylglycines. **Amino Acids**, v. 27, p. 69-74, 2004.

ÁRKI, A. et al. High-performance liquid chromatographic separation of stereoisomers of β -aminoacids and a comparison of separation efficiencies on chirobiotic T and TAG columns. **Chromatographia Supplement**, v. 60, p. 43-54, 2004.

ARMSTRONG, D.W. et al. Macrocyclic antibiotics as new class of chiral selectors for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1473-1484, 1994.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones; **Ars Pharmaceutica**, v. 39, p. 23-29, 1998.

BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P.R.R. Substâncias enantioméricamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, p. 647, 1997.

BECHOLD, M.; HEINEMANN, M.; PANKE, S. Suitability of teicoplanin-aglycone bonded stationary phase for simulated moving bed enantioseparation of racemic aminoacids employing composition-constrained eluents. **Journal of Chromatography A**, v. 1113, p. 167-176, 2006.

BEECHAM GROUP PLC. Powell et al. Preparation of immobilized hydantoinase stabilized with divalent metal ions. Us nº 5.283.182, 1 fev. 1994.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERTHOD A. et al. Separation of chiral sulfoxides by liquid chromatography using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 53-69, 2002.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 877-882, 2006.

BLANCO R.M. et al. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme Microbiology Technology**, v.11, p. 353-359, 1989.

BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydre reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRISTOL-MYERS COMPANY. Joseph H.Groszman, Glenn A, Hardcastle Jr. Production of amoxicillin. Us nº 3.980.637, 14 set. 1976.

BRUGGINK, A. et al. Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. **Organic Process Research & Development**, v. 2, p. 128-133, 1998.

BURTON, S.G. et al. Production of enantiomerically pure amino acids: characterization of South African hydantoinases and Hydantoinase-production bacteria. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 301-305, 1998.

BURTON, S.G.; DORRINGTON, R.A. Hydantoin-hydrolysing enzymes for the enantioselective production of aminoacids: new insights and applications. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2737-2741, 2004.

CAO, L. et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 665-670, 2001.

CARDIAS, H.T.C. Estudo da imobilização multipontual de penicilina G acilase em sílica macrosporosa ativada com glutaraldeído. 25 de julho, 1996. 101p. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 06 de nov, 1996.

CARDIAS, H.T.C. Estudo da Síntese de Antibióticos β -Lactâmicos Semi-Sintéticos Catalisada por Diferentes Derivados de Penicilina G Acilase. 2 de março de 2000. 208p. **Tese Doutorado em Engenharia Química**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 29 de set, 2000.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: **EdUFSCar**, p. 77, 2001.

CHANKVETADZE, B et al. Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 27, p. 467, 2002.

CHAO, Y.P. et al. Optimum ratio of D-carbamoylase to D-hydantoinase for maximizing D-p-hydroxyphenylglycine productivity. **Biotechnology Letters**, v. 0, p. 99-103, 2000.

CLAYDEN, J. - GREEVES, N.; WARREN, S. E WOTHERS, P. — **Organic Chemistry**, Oxford University Press, Oxford, 2000.

CHEON, Y. et al. Crystal structure of D-hidantoinase from *Bacillus stearothermophilus*: insight into the stereochemistry of enantioselectivity. **Biochemistry**, v. 41, p. 8589-8597, 2002.

CHEON, Y.H. et al. Stabilization of D-hydantoinase by intersubunit cross-linking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p. 29-35, 2000.

CHERN, J.T.; CHAO, Y.P. Chitin-binding domain based immobilization of D-hydantoinase. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 267-275, 2005.

CHIOU, S.H.; WU, W.T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, p. 197-204, 2004.

CHUNG, J.H. et al. Thermostable hydantoinase from a hyperthermophilic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 30, p. 867-874, 2002.

COELHO, F.A.S. Fármacos e quiralidade. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**; v. 3, p. 23-32, 2001.

DANE, E.; DOCKNER, T. Synthesis of 6-[(D- α -amino- α -phenylacetyl)amino]-penicillanic acid using β -dicarbonyl compounds as amino-protecting groups. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 3, p. 439, 1964.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n.4, p.623-630.

DURHAM, D.R; WEBER, J.E. Properties of D-Hydantoinase from *Agrobacterium tumefaciens* and its use for the preparation of N-carbamyl D-amino acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, p. 1095-1100, 1995.

ELANDER, R.P. Industrial Production of β -lactam antibiotics. **Application Microbial Biotchenology**, v. 61, p. 385-392, 2003.

FAN, C.H.; LEE, C.K. Purification of D-hydantoinase from *Aduzi bean* and its immobilization for N-carbamoyl-D-phenylglycine production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 157-164, 2001.

FANGKANGWANWONG, J.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v. 47, p. 6438-6445, 2006.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 181-189, 1999.

FERREIRA, A.L.O. et al. Improving selectivity and productivity of the enzymatic synthesis of ampicillin with immobilized penicillin G acylase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 519-529, 2004.

FOSTER, I.M.; DORRINGTON, R.D.; BURTON, G.S. Enhanced hidantoinase and N-Carbamoylase activity on immobilization of *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 67-72, 2003.

GARCIA, M.J.; AZERAD, R. Production of ring-substituted D-phenylglycine by microbial or enzymatic hydrolysis/deracemisation of the corresponding D,L-hydantoins. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, p. 85-92,1997.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GILBERT, M.T. "Chiral Chromatography" In: **High Performance Liquid Chromatography**. Gilbert, M.T. (ed), Bristol, Wright, 1987, p.291-312.

GIORDANO, R.C. et al. Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the view point of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 27-41, 2006.

GOKHALE, D.V. et al. Chemoenzymatic synthesis of D(-)-phenylglycine using hydantoinase of *Pseudomonas desmolyticum* resting cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 353-357, 1996.

GONÇALVES, L.R.B. Estudo cinético da síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em glioxil-agarose. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia, São Carlos, 2001.

GONÇALVES, V.L. et al. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 6-12. 2005.

GUISÁN, J.M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.

GUISÁN, J.M. Immobilization and stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.375-382, 1987.

HAKIMELAHI, H.G. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of β -lactam-based production. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 10, p. 3489-3498, 2002.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

JANDERA, P.; BACKOVSKÁ, V; FELINGER, A. Analysis of the band profiles of the enantiomers of phenylglycine in liquid chromatography on bonded teicoplanin columns using the stochastic theory of chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 67-77, 2001.

JIA, H.H. et al, The immobilization of D-hydantoinase and characterization under classic condition and microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p.74-79, 2006.

KACZMARSKI, K. et al. Application of general rate model and the generalized maxwell-stefan equation to the study of the mass transfer kinetics of pair of enantiomers; **Journal of Chromatography A**, v. 962, p. 57-67, 2002.

KISHAN, K.V.R. et al. Molecular Structure of D-Hydantoinase from *Bacillus* sp. AR9: Evidence for Mercury Inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, p. 95-105, 2005.

KOSTOVA, A.; BART, H.- J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures: II- Modelling of separation process. **Separation and Purification Technology**, v. 54, p. 315-321, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000

KUMAR, M.N.V.R.; SINGH, P.; DUTTA, P. K. Effect of swelling on chitosan-amine oxide gel in extended drug delivery. **Indian Drugs**, v.36, p.393, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEE, D.C.; LEE, S.G.; KIM, S.G. Production of D-p-hydroxylphenylglycine from D,L-Hydroxylphenyl hydantoin using immobilized thermostable D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus* SD-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 35-40, 1996.

LEE et al. Mass production of thermostable D-hydantoinase by batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a constitutive expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 449-455, 1997.

LEE, C. K.; FAN, C. H. Enzymatic synthesis and subsequent racemization rates determination of optically active D-5-phenylhydantoin and D-5-hydroxylphenylhydantoin; **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p.659-666, 1999.

LEE, D.C; KIM, H.S. Optimization of heterogeneous reaction system for the production of optically active D-aminoacids using thermostable D-hydantoinase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 729-738, 1998.

LEHNINGER, Albert Lester, 1917-1986; NELSON, David L.; COX, Michael M.. Lehninger princípios de bioquímica. Arnaldo Antonio Simões (Coord.); Wilson Roberto Navega Lodi (Coord.). Arnaldo Antonio Simoes (Trad.); Wilson Roberto Navega Lodi (Trad.). 4ed. SãoPaulo: SARVIER, 2006. 1202p. ISBN 85-7378-166-1.

LI, N.; BAI, R. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 6692-6700, 2005.

LLISZ, I.; BERKECZ, R.; PÉTER, A. HPLC separation of aminoacids enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: a review. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1305-1321, 2006.

LO, H.H. et al. Enantioselective Synthesis of (S)-2-Amino-4-phenylbutanoic Acid by the Hydantoinase Method. **Chirality**, v. 15, p. 699-702, 2003.

LÓPEZ-GALEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p.1-10, 2005.

LOUWRIER A.; KNOWLEST, C. J. The aim of industrial enzymic amoxycillin production: characterization of novel carbamoylase enzyme in the form of a crude cell-free extract. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p.143-149, 1997.

MACHADO, D.C.G. et al. Enzyme resolution of D-L-Phenylglycine. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3186-3189, 2005.

MANRICH, A et al. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 54-61, 2008.

MARTINEZ-RODRÍGUES, S. et al. Biochemical characterization of a novel hydantoin racemase from *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Biochimie**, v. 86, p. 77-81, 2004.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**; v. 39, p. 274-280, 2006a.

MATEO, C. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. In: Guisan JM editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press: 2006b. pp. 129-141.

MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy Supports for Stabilization of Industrial Enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629-634, 2002.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.509-515. 2000.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MAY, O. et al. Catalytic and Strutral function of zinc for hydantoinase from *Arthrobacter aureus* DSM 3745. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, p. 211-218, 1998.

MAY, O.; NGUYEN, P.T.; ARNOLD, F. Inverting Enantioselectivity by Directed Evolution of Hydantoinase for improved production of L-methionine. **Nature Biotechnology**, v.18, p. 317-320, 2000.

MENDES, A.A. et al. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. **In: 10th International Conference on Chitin and Chitosan - 10th I.C.C.C., Montpellier-FR, Livro de Abstracts, 1: 95-96, 2006.**

MENDES, A.A. et al. Influência do tipo de suporte e dos métodos de ativação sobre as propriedades catalíticas de lipase imobilizada multipontualmente. **In: XXI Simpósio Iberoamericano de Catálise, Málaga-Espanha, 2008.**

MENEZES, J.C. et al. "Biotecnologia microbiana: a produção de penicilina", cap. 12, 15 pp. in "**Biotecnologia: fundamentos e aplicações**", N. Lima e M. Mota (ed.), DIFEL, 2000.

MORIN, A. Use of D-hydantoinase extracted from legumes to produce N-carbamoyl-D-amino acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 208-214, 1993.

OGAWA, J.; S. SHIMIZU. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 367-375, 2002.

OLIVIERI, R. et al. Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 2173-2183, 1981.

OSPINA S. et al. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by Penicillin acylase; **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 462-469, 1996.

PALOMO, J.M. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different heterofunctional epoxy resins hydrolytic resolution of (R, S)-2-butyroyl -2 phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21: p. 201-210, 2003.

PARK J.-H. et al. Biochemical properties of thermostable D-hydantoinase from *Bacillus thermocatenulatus* GH-2. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864, p. 337-340, 1998.

PARK J.-H. et al. Modeling and kinetic analysis of the reaction system using whole cells with separately and co-expressed D-hydantoinase and N-carbamoylase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, p. 779-793, 2002.

PEDROCHE J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint between enzyme-supports linkage and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v 40, p. 1160-1166, 2007.

PÉTER, A.; TOROK, R.; ARMSTRONG, D.W. Direct high-performance liquid chromatographic separation of unusual secondary aminoacids and a comparison of the performances of Chirobiotic T and TAG columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, p. 229-235, 2004.

RAGNITZS, K.; SYLDATK, C.; PIETZSCH, M. Optimization of the immobilization parameters and operational stability of immobilized hidantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aureescens* for the production of optically pure L-amino acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 713-720, 2001.

RAI, R.; TANEJA, V. Production of D-aminoacds using immobilized D-hydantoinase from lentil, *Lens esculenta*, seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 658-662, 1998.

RAJAN, M. Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications.

<http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>, 2004. Acessado em 14 de janeiro de 2006.

RODRIGUES, D.S. et al. Multipoint covalent immobilization microbial of lipase on chitosan and agarose actived by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.

SADANA, A.; HENLEY, J.P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.717-723, 1987.

SHARMA, R. et al, Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627-662, 2001.

SIEMANN, M. et al. A D-specific hydantoin amidohydrolase: properties of the metalloenzyme purified from *Arthrobacter crystallopoites*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 387-397, 1999.

SNYDER, L. R. et al. "Chiral Separations" In: **Practical HPLC Method Development**, New York, John Wiley & Sons Inc., 2 ed., 1997, p. 537-615.

SUDGE, S. S. et al. Production of D-hydantoinase by halophilic *Pseudomonas* sp. NCIM 5109. **Application Microbial Biotchenology**, v. 49, p. 594-599, 1998.

SUNDBERG, L.; PORATH, J. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. **Journal of Chromatography**, v. 90, p. 87-98, 1974.

SYLDATK, C. et al. Microbial hydantoinases - Industrial enzymes from the origin of life? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 293-309, 1999.

SZTOJKOV-IVANOV, A. et al. Comparison of separation efficiency of macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases for the LC enantioseparation of β -aminoacids. **Chromatographia**, v. 64, p. 89-94, 2006.

TAPIA, C et al. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 65-75, 2004.

TARDIOLI, P.W. et al. Hydrolyses of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxilagarose. **Biotechnololy Progress**, v.19, p. 352-360, 2003.

TARDIOLI, PW. Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro de Queijo usando Carboxipeptidase A e Alcalase Imobilizadas Multipontualmente em Agarose. 22 de ago, 2003. 173p. **Tese de Doutorado em Engenharia Química**. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 06 de jan, 2003.

TAYLOR, R. F. Protein immobilization, fundamentals and applications. Cambridge, Massachussetts, p. 143-145, 1991.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p.616-623, 2002.

WARD, T.J.; FARRIS, A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review; **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 73-89, 2001.

WHITE, C. A.; SUBRAMANIAN, G. "An Introduction to enantioseparation by liquid chromatography." In: **A practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography**. Subramanian, G. (Ed). Nova Iorque, Weinheim, VCH, 1-17, 1994.

www.bioscience.beads.com. Acessado em 05/02/2007.

www.darmathouth.edu) Acessado em 04/03/2006.

www.sigmaaldrich.com. Acessado em 23/07/2008.

XIAO, T.L. et al. Separation of the enantiomers of substituted dihydrofurocoumarins by HPLC using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases, **Analytical and Biochemistry Chemistry**, v. 377, p. 639-654, 2003.

XU, Z. et al. Crystal structure of D-hidantoinase from *Burkholderia picketti* at 2.7Å: insights into the molecular basis of enzyme thermostability. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 4038-4049, 2003.

YASHIMA, E. "Polisaccharide-based chiralstationary phases for High Performance Liquid Chromatography enantioseparation". **Journal of Liquid Chromatography A**, v. 906, p. 105-125, 2001.

YIN, B. et al. Production of D-aminoacids precursors with permeabilized recombinant *Escherichia coli* with D-hydantoinase activity. **Process Biochemisty**, v. 35, p. 915-921, 2000.

ZARZYCKI, P.K. et al. Thermodynamic study of the retention behaviour of selected macrocycles using reversed-phase high-performance thin-layer chromatography plates and methanol-water mobile phases. **Journal of Chromatography A**, v. 787, p. 227-233, 1997.