UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DISSERTAÇÃO

**INVESTIGAÇÃO DA CINÉTICA DE LIPASE
ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

DENIS MASSUCATTO

SÃO CARLOS

2009

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 01/06/2009

Denis Massucatto

DENIS MASSUCATTO

INVESTIGAÇÃO DA CINÉTICA DE LIPASE
ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Dissertação apresentada como requisito parcial para conclusão do curso de Mestrado em Ciências, na área de Físico-Química, do Instituto de Química de São Carlos

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

São Carlos

2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Prof. Marcelo, que me orientou durante esse tempo, de modo a permitir meu engrandecimento como cientista. Agradeço aos meus colegas de laboratório, Ana, Rafael, Manu pela companhia e por me ajudarem no trabalho do dia-a-dia e à Carol, que trabalhou em conjunto neste trabalho.

Agradeço à minha família e aos meus amigos, principalmente os que moraram comigo na república; por sempre estarem ao meu lado, tanto nos bons quanto nos maus momentos e pelas discussões importantes, sendo elas no âmbito de meu trabalho ou mais amplas que isto.

Agradeço a Novozymes (Araucária-PR) por ceder gentilmente a enzima Novozym435, tema de estudo deste trabalho.

Agradeço ao CNPq, à FAPESP, ao IQSC e ao povo paulista por viabilizar o suporte financeiro de meu trabalho.

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto."

Albert Einstein

RESUMO

As enzimas constituem parte essencial à vida, sendo catalisadores capazes de aumentar em várias ordens de grandeza a velocidade da reação. As lipases, que catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos, são enzimas versáteis e de fácil obtenção e por isso estão presentes em diversos setores da indústria e também constituem tema de estudo no meio acadêmico. Tem-se como os objetivos principais deste trabalho a elaboração de um método para se avaliar a cinética hidrólise de lipase suportada por intermédio de espectroscopia de fluorescência. O sistema utilizado foi o DAQ (diaceto-quinizarina) / quinizarina. Este sistema é propício, pois a DAQ, que não é fluorescente, quando hidrolisada resulta na quinizarina, altamente fluorescente. Para se tratar a cinética de hidrólise foi desenvolvido um modelo considerando-se duas etapas sequenciais de hidrólise, uma vez que a enzima catalisa a quebra de apenas um grupo éster por ciclo catalítico. O modelo mostrou-se bastante fiel no ajuste dos dados experimentais obtidos, sendo possível obter a constante cinética envolvida no processo global de hidrólise, que constitui uma combinação linear das constantes cinéticas dos processos elementares.

Palavras-chave: Fluorescência, lipase, hidrólise enzimática, quinizarina, reação em duas etapas sequenciais.

ABSTRACT

Enzymes are essential to life and are capable to increase in many orders of magnitude the velocity of reaction. Lipases, that catalyses the hydrolysis of triacylglyceride, are versatile enzymes and easy to obtain and are present in many industry segments and also constitutes academic studies. The objective of this work is the elaboration of a method to evaluate the hydrolysis kinetic of immobilized lipase through fluorescence spectroscopy. The system used was DAQ (diacetate-quinizarin) / quinizarin. This system is auspicious because DAQ, not-fluorescent, when hydrolyzed results quinizarin, highly fluorescent. To treat the hydrolysis kinetic, a model that consider a two-step sequential reaction were developed, once the enzymes breaks only one ester in each catalytic cycle. The model agreed with the experimental data, and it was possible to obtain the global kinetic constant, that is a linear combination of the elementary constants

Keywords: fluorescence, lipase, enzymatic hydrolysis, quinizarin, two-step sequential reaction.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ENZIMAS.....	1
1.1.1 <i>Cinética enzimática</i>	4
1.1.2 <i>Lipases</i>	7
1.2 FOTOFÍSICA.....	11
1.3 CROMÓFOROS.....	14
1.4 ANTRAQUINONAS	15
1.4.1 <i>Quinizarina</i>	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAIS.....	18
3.1 REAGENTES.....	18
3.2 SOLVENTES	18
3.3 EQUIPAMENTOS	18
4 MÉTODOS.....	19
4.1 SÍNTESE DA 1,4-DIACETO-QUINIZARINA.....	19
4.2 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA PRESENTE NA NOVOZYM435.....	20
4.3 ENSAIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	21
4.4 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO	22
4.4.1 <i>Contagem de Fótons</i>	23
4.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DAQ.....	30
5.1.1 <i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	30
5.1.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	31
5.2 ABSORÇÃO E FLUORESCÊNCIA	32
5.3 COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR.....	34
5.3.1 <i>Quinizarina</i>	34
5.3.2 <i>DAQ</i>	36
5.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO	37
5.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA PRESENTE NA NOVOZYM435.....	39
5.6 MODELO CINÉTICO	39
5.6.1 <i>Cinética de hidrólise</i>	47
5.7 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	50
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE RADIAÇÃO DE ACORDO COM A ENERGIA.	12
TABELA 2. RELAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NITROGENADOS PRESENTES NA LIPASE B.	20
TABELA 3. RELAÇÃO DOS PICOS PRINCIPAIS DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO IV DA QUINIZARINA E SUA RELAÇÃO ESTRUTURAL.	31
TABELA 4. TEMPOS DE VIDA DA QUINIZARINA EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS.	38
TABELA 5. PERCENTUAL EM MASSA DOS ELEMENTOS C, H E N DE UMA AMOSTRA DE NOVOZYM435.	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i>	1
FIGURA 2. GRÁFICO DE ENERGIA POR COORDENADA DE REAÇÃO REPRESENTANDO A DIFERENÇA DE ENERGIA ENTRE O ESTADO DE TRANSIÇÃO DA REAÇÃO NÃO CATALISADA (PRETO) E A CATALISADA (AZUL).	3
FIGURA 3. GRÁFICO DE VELOCIDADE DE REAÇÃO POR CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA UMA REAÇÃO CATALISADA POR ENZIMA.	7
FIGURA 4. REAÇÃO GLOBAL DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO.	8
FIGURA 5. MECANISMO GERAL DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE UM ÉSTER.	10
FIGURA 6. NOTAÇÃO DE CLEELAND PARA UMA REAÇÃO QUE SEQUE O MECANISMO PING PONG BI BI.	11
FIGURA 7. DIAGRAMA DE JABLONSKI. OS NÍVEIS ENERGÉTICOS NÃO ESTÃO EM ESCALA.	13
FIGURA 8. TAUTOMERIA CETO-ENÓLICA DA QUINIZARINA E AO FINAL A REPRESENTAÇÃO CANÔNICA MOSTRANDO A RESSONÂNCIA DOS ANÉIS QUASI-AROMÁTICOS.	16
FIGURA 9. ESQUEMA DA REAÇÃO DE SÍNTESE DA DAQ.	19
FIGURA 10. IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE UMA PARTÍCULA DE NOVOZYM435.	21
FIGURA 11. ESQUEMA DA REAÇÃO GLOBAL DE HIDRÓLISE, CATALISADO POR LIPASE, DA DAQ.	21
FIGURA 12. PLANTA BAIXA DA INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA PARA AS MEDIDAS RESOLVIDAS NO TEMPO.	23
FIGURA 13. FOTOGRAFIA DOS EQUIPAMENTOS INSTALADOS NO GRUPO DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR. À ESQUERDA ESTÁ A APARELHAGEM PARA A FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO E À DIREITA O MICROSCÓPIO CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA.	24
FIGURA 14. CONVERSÃO AMPLITUDE-TEMPO EM UM TAC.	26
FIGURA 15. PLANTA BAIXA DA INSTRUMENTAÇÃO: FN = FILTRO DE NOTCH, BS = SEPARADOR DE FEIXES (DICRÓICO). XYZ = NANOPOSICIONADOR, APD = FOTODIODO AVALANCHE, IX71 = MICROSCÓPIO INVERTIDO, PC = MICROCOMPUTADOR.	27
FIGURA 16. FOTOGRAFIA DA SEQUÊNCIA DE FILTROS E DETECTORES UTILIZADOS.	28
FIGURA 17. PROJEÇÃO DA FORMA UTILIZADA. À ESQUERDA ESTÁ REPRESENTADA A VISTA SUPERIOR E À DIREITA ESTÁ A VISTA ISOMÉTRICA.	29
FIGURA 18. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO DA QUINIZARINA.	30
FIGURA 19. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA DAQ.	31
FIGURA 20. ESPECTRO OBTIDO POR RMN DE PRÓTON DE QUINIZARINA EM CDCl ₃	32
FIGURA 21. ESPECTRO OBTIDO POR RMN DE PRÓTON DE DAQ EM CDCl ₃	32
FIGURA 22. ESPECTROS DE ABSORÇÃO. DAQ (TRACEJADO) E QUINIZARINA (LINHA CONTÍNUA).	33
FIGURA 23. ESPECTROS DE EMISSÃO DA QUINIZARINA (LINHA CONTÍNUA) E DE SEU DERIVADO DAQ (TRACEJADO).	34
FIGURA 24. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA QUINIZARINA EM N-HEXANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	35
FIGURA 25. GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA VS. CONCENTRAÇÃO DE QUINIZARINA.	35
FIGURA 26. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE DAQ EM N-HEXANO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	36
FIGURA 27. GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA VS. CONCENTRAÇÃO DE DAQ.	36
FIGURA 28. GRÁFICO DE DECAIMENTO DA QUINIZARINA REALIZADO EM DECALINA: EM VERDE A FUNÇÃO DE RESPOSTA INSTRUMENTAL, EM PRETO O DADO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE E EM AZUL O AJUSTE TEÓRICO.	37
FIGURA 29. GRÁFICO DE DECAIMENTO DA QUINIZARINA REALIZADO EM N-HEXANO: EM VERDE A FUNÇÃO DE RESPOSTA INSTRUMENTAL, EM PRETO O DADO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE E EM AZUL O AJUSTE TEÓRICO.	38
FIGURA 30. GRÁFICO DE DECAIMENTO DA QUINIZARINA REALIZADO EM CICLOEXANO: EM VERDE A FUNÇÃO DE RESPOSTA INSTRUMENTAL, EM PRETO O DADO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE E EM AZUL O AJUSTE TEÓRICO.	38
FIGURA 31. ESQUEMA DE REAÇÕES PARA O MODELO CINÉTICO DE HIDRÓLISE EM DUAS ETAPAS CONSECUTIVAS.	39
FIGURA 32. REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS APRESENTADAS NA FIGURA 31.	39
FIGURA 33. SIMULAÇÃO DA HIDRÓLISE. EM PRETO S ₂ , EM AZUL S ₁ E EM VERMELHO S ₀	41
FIGURA 34. SIMULAÇÃO DA HIDRÓLISE DE QUINIZARINA COM ERRO ALEATÓRIO. NO TOPO O ERRO SIMULADO FOI DE 1%, NO MEIO, 5% E EMBAIXO, 10%.	44

FIGURA 35. MODELO CINÉTICO PROPOSTO PARA A PRODUÇÃO DE QUINIZARINA EM DECALINA.	45
FIGURA 36. FOTOGRAFIA DA ENZIMA SUPORTADA ANTES (ESQUERDA) E DEPOIS (DIREITA) DA REAÇÃO.	48
FIGURA 37. ACOMPANHAMENTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA DAQ REALIZADO EM <i>N</i> -HEXANO.	49
FIGURA 38. GRÁFICO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA VS. TEMPO. OS CÍRCULOS REPRESENTAM OS DADOS EXPERIMENTAIS E A LINHA CONTÍNUA O AJUSTE PELA EQUAÇÃO 32.	49
FIGURA 39. GRÁFICO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA VS. TEMPO. OS CÍRCULOS REPRESENTAM OS DADOS EXPERIMENTAIS E A LINHA CONTÍNUA O AJUSTE PELA EQUAÇÃO 43	50
FIGURA 40. HISTOGRAMA DE CONTAGEM DE FÓTONS COM INCREMENTO DE TEMPO DE 10 MS.	51
FIGURA 41. HISTOGRAMA <i>ON-OFF</i> DOS 120 PRIMEIROS CANAIS.	52
FIGURA 42. HISTOGRAMA DE TEMPO <i>OFF</i>	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores de sistemas biológicos e são macromoléculas *sine qua non* à vida, pois atuam em praticamente todas as reações químicas dos seres vivos. São constituídas por aminoácidos e sua massa molar pode variar de poucos milhares até milhões de unidades de massa atômica (u.m.a.). A estrutura tridimensional que a enzima assume é fundamental para garantir que o sítio ativo mantenha uma configuração favorável para a reação. A estabilidade de sua estrutura enovelada se dá por interações eletrônicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos (ligações de hidrogênio, interações iônicas, íon-dipolo, dipolo-dipolo, hidrofóbicas e forças de van der Waals) (Silverman, 2002).

Há enzimas que para manter sua atividade catalítica necessitam da presença de outro componente, chamado *cofator*, que pode ser íons metálicos ou moléculas orgânicas complexas (*e.g.* NAD^+), estas últimas chamadas de *coenzimas* (Nelson, et al., 2005).

Figura 1. Estrutura tridimensional da Lipase B de *Candida antarctica*.

Apesar de constituir uma molécula de massa molar elevada, a reação química ocorre em uma pequena porção da enzima, chamada de sítio ativo ou sítio catalítico, representado na Figura 1 (Uppenberg, et al., 1994). A alta especificidade da enzima por seu substrato se dá pela conformação de seu sítio ativo, que possui uma forma complementar ao substrato. O primeiro modelo, proposto por Fischer, leva em conta um encaixe do tipo chave-fechadura (*lock and key*) no qual a enzima possui forma complementar ao substrato em seu estado de mais baixa energia. Mas este modelo era falho ao explicar como enzimas específicas para substratos relativamente pequenos eram capazes de atuar sobre substratos análogos mais volumosos. Assim, outro modelo foi proposto por Koshland: a enzima possui forma complementar ao estado de transição. Neste caso, o substrato, ao entrar no sítio ativo, possui apenas alguns poucos pontos de interação com a enzima. Estas interações iniciais favorecem a formação de novos pontos de interação, que mudam a conformação do substrato e da enzima sucessivamente até o ponto em que o substrato está inteiramente ligado à enzima e sua conformação é a do estado de transição. Neste ponto, nem a enzima nem o substrato retêm suas distâncias e ângulos interatômicos iniciais (daí o nome encaixe induzido). A enzima atua como um estabilizador do estado de transição, baixando sua energia, o que favorece a reação (Figura 2).

Além da contribuição energética na ligação do substrato à enzima têm-se a contribuição entrópica da água. O substrato, ao ligar-se à enzima, toma o espaço antes ocupado por moléculas de água. Estas moléculas ao deixarem o sítio ativo e retornarem ao seio da solução têm sua desordem aumentada, e apesar da entropia do substrato haver diminuído, o aumento da entropia da água é mais pronunciada por participarem um número maior de moléculas no processo. Portanto, no processo global, a ligação do substrato à enzima também é entropicamente favorável.

Figura 2. Gráfico de energia por coordenada de reação representando a diferença de energia entre o estado de transição da reação não catalisada (preto) e a catalisada (azul).

As lipases apresentam em seu sítio ativo o que se chama *tríade catalítica*: uma composição de três aminoácidos, numa configuração espacial única, que participam efetivamente da reação.

As enzimas atuam apenas no aspecto cinético das reações, i.e. acelerando a taxa de conversão de reagentes a produtos, podendo magnificar a taxa de reação de 5 a até 17 ordens de grandeza (Nelson, et al., 2005). Vale ressaltar que a enzima, como catalisador, altera apenas a velocidade da reação, mantendo inalterada a diferença de energia livre (Figura 2).

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam, sendo divididas em seis principais classes: Oxidoredutases, Transferases, Hidrolases, Liasas, Isomerases e Ligases.

1.1.1 Cinética enzimática

Segundo o Livro de Ouro da União Internacional da Química Pura e Aplicada (goldbook.iupac.org) uma reação química é definida como um processo que resulta na interconversão de espécies químicas. O mecanismo de reação é o conjunto de etapas elementares sequenciais que resultam em uma reação complexa¹. Há casos em que o mecanismo é relativamente simples e sua comprovação de fácil acesso experimental, mas há casos em que seus mecanismos permanecem até hoje obscuros, por demandar uma excepcional sofisticação experimental. Assim, o objeto de estudo da cinética química é a investigação dos mecanismos das reações químicas, suas taxas de conversão de reagentes a produtos, a factibilidade ou impossibilidade de reações.

Um procedimento para se avaliar a cinética de uma reação é o método das velocidades iniciais, em que a concentração do reagente é variada e apenas a velocidade inicial de formação do produto (ou consumo do reagente, dependendo da técnica utilizada) para cada concentração de reagente é considerada. Para os casos em que a reação é bimolecular, utiliza-se o método do isolamento, no qual a concentração de um dos reagentes é mantida em grande excesso (em torno de três ordens de grandeza) enquanto varia-se a concentração do outro reagente, sendo este procedimento repetido com o segundo reagente em excesso e variando-se a concentração do primeiro. A constante que se obtém com método é uma constante aparente, pois é na verdade o produto da concentração do reagente em excesso pela constante de segunda ordem. Esta reação com um dos reagentes em excesso é dita pseudo-primeira ordem, pois uma vez que há um reagente em excesso a velocidade depende apenas da concentração do outro reagente.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maude Menten aprimoraram um modelo cinético para descrever o comportamento enzimático, que é utilizado até hoje pela comunidade

¹ Por *complexa* entende-se a reação global ou resultante.

científica. O primeiro postulado diz que o processo de catálise enzimática ocorre em duas etapas sequenciais:

Esta primeira etapa é rápida e reversível, enquanto que a segunda etapa descrita por:

é a etapa lenta e determinante da reação. Nestas reações, **E** representa a enzima, **S** o substrato, **ES** o complexo enzima-substrato e **P** o produto formado. Na primeira etapa, o substrato liga-se reversivelmente à enzima, formando o chamado complexo enzima-substrato. Num diagrama de energia, este complexo representa um mínimo local, portanto, estável. Este complexo formado é de fundamental importância para as considerações a serem feitas sobre o processo de catálise enzimática, uma vez que para se obter uma relação quantitativa entre a concentração de substrato e a taxa da reação é necessário supor que o complexo enzima-substrato encontra-se em estado estacionário, ou seja, a variação de sua concentração com o tempo pode ser considerada nula. Este conceito foi introduzido em 1925 por G.E. Briggs e Haldane. Outra asserção feita por Michaelis e Menten foi que a etapa determinante da reação global é a formação do produto a partir do complexo enzima-substrato. Assim, a velocidade inicial da reação é proporcional à concentração do complexo enzima-substrato:

$$V_0 = k_2[\text{ES}]$$

Equação 1

Equacionando o termo ES, têm-se a equação diferencial que define sua variação temporal:

$$\frac{dES}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Equação 2

Mas o valor de $[E]$ que representa a enzima livre em solução nem sempre é de fácil determinação experimental. Por isso esta quantidade é expressa em termos da concentração total de enzima e do complexo enzima-substrato (conservação de massa):

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

Equação 3

Assim, aplicando-se a Equação 3 na Equação 2 e assumindo o estado estacionário para ES e finalmente rearranjando a expressão, encontra-se o seguinte valor:

$$[ES]_{ee} = \frac{[E]_T[S]}{[S] + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} = \frac{[E]_T[S]}{[S] + K_m}$$

Equação 4

O subscrito *ee* denota a suposição do estado estacionário para ES, K_m representa a constante de Michaelis-Menten. Substituindo o valor de ES na Equação 1, resulta na expressão:

$$V_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_m + [S]}$$

Equação 5.

Uma vez que a velocidade máxima da reação é atingida quando $[ES] = [E]_T$, obtêm-se a equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Equação 6.

A constante K_m tem unidade de mol por litro e seu valor corresponde à concentração de substrato necessária para que a reação atinja metade de sua velocidade máxima. A constante de Michaelis-Menten representa a afinidade da enzima pelo substrato: quanto menor a constante, maior a afinidade, pois é necessária uma quantidade menor de substrato para que se alcance a velocidade máxima.

A existência de uma velocidade máxima para reações catalisadas por enzima se dá pela saturação de seus sítios ativos, uma vez que a quantidade de enzima em solução é finita. Neste ponto a reação é de ordem zero em relação à concentração de substrato.

Figura 3. Gráfico de velocidade de reação por concentração de substrato para uma reação catalisada por enzima.

1.1.2 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) pertencem à classe das hidrolases e catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia longa (lipídeos) utilizando moléculas de água (Figura 4). Estão presentes em grande parte dos seres vivos e atuam no sistema digestório destes. As lipases possuem uma grande flexibilidade em seu sítio ativo e por isso são capazes de acomodar uma grande diversidade de substratos análogos ao natural, *e.g.* alicíclicos, bicíclicos, aromáticos, alifáticos (Bornscheuer, et al., 2005).

Figura 4. Reação global de hidrólise de um triacilglicerídeo.

As lipases formam uma família estruturalmente semelhante, com diferenças sutis em alguns resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio catalítico (Svendsen, 2000). Aproximadamente 50 lipases de diferentes origens foram identificadas, purificadas e caracterizadas (Paiva, et al., 2000). As lipases podem ser obtidas através de extração e purificação a partir de tecidos animal ou vegetal ou pelo cultivo em bactérias, com o auxílio da biologia molecular.

As lipases apresentam um fenômeno chamado de *ativação interfacial*, no qual a enzima tem sua atividade catalítica aumentada quando a mesma se encontra adsorvida numa interface água/solvente orgânico. O fenômeno é explicado pela presença de uma cobertura (*lid*) em sua estrutura, formada por aminoácidos hidrofóbicos, que permanecem na fase orgânica, enquanto a outra porção da enzima mantém-se na fase aquosa. O sítio ativo é exposto neste processo, aumentando sua acessibilidade ao substrato. Além da alteração estrutural da enzima, há o favorecimento ao acesso do substrato – os lipídeos estão em maior concentração na fase orgânica – e os produtos (ácido graxo + glicerol) são liberados para a fase aquosa (Bornscheuer, et al., 2005).

A enzima utilizada nos ensaios foi a fração B de lipase do fungo *Candida antarctica* (CALB), imobilizada por adsorção (Christensen, et al., 2003) em partículas esféricas de polimetil metacrilato, comercialmente conhecida como Novozym435. A

imobilização de enzimas tem grande apelo industrial, uma vez que sua estabilidade é significativamente aumentada (Mateo, et al., 2007).

A CALB é constituída por 317 resíduos de aminoácidos e possui massa molar de 33kDa (Uppenberg, et al., 1994). Pertence à família das serina-hidrolases e sua tríade catalítica é composta pelos aminoácidos Ser₁₀₅, Asp₁₈₇ e His₂₂₄. O ciclo catalítico inicia-se com a abstração do próton da hidroxila da Ser₁₀₅ pelo nitrogênio na posição 3 da His₂₂₄, o que aumenta seu caráter nucleofílico. A alcóxila formada, por sua vez, realiza um ataque nucleofílico à carbonila do éster do substrato. Este processo leva à formação de um intermediário tetraédrico composto pela Ser₁₀₅ e o éster. A eliminação do álcool ocorre na segunda etapa, com o restabelecimento da carbonila e a transferência do próton do íon imidazolínio à alcóxila, que deixa o sítio ativo na forma de álcool. Ao éster formado pela Ser₁₀₅ e o ácido carboxílico proveniente do substrato dá-se o nome de acil-enzima, ou enzima acilada. A seguir, uma molécula de água adiciona-se à carboxila da acil-enzima, formando um segundo intermediário tetraédrico. O ácido carboxílico deixa a enzima quando este segundo intermediário tem sua carbonila restaurada, e com a saída da alcóxila da Ser₁₀₅ que retira o próton do íon imidazolínio formado na etapa anterior, restaurando assim os resíduos de aminoácido como no início. Este ciclo está apresentado na Figura 5.

Figura 5. Mecanismo geral de hidrólise enzimática de um éster.

Este mecanismo enzimático é chamado de Ping Pong, no qual a enzima libera ao menos um produto antes da entrada de outro substrato. A notação de Cleeland é utilizada para uma melhor visualização do processo. Como visto na Figura 6, onde *A* e *B* representam os substratos (reagentes), *P* e *Q* os produtos, *E* a enzima, *EA* e *EB* os complexos enzima substrato formados com os reagentes *A* e *B* respectivamente e *Acil-E* representa a enzima acilada (Voet, et al., 2004).

Figura 6. Notação de Cleeland para uma reação que segue o mecanismo Ping Pong Bi Bi.

No caso das lipases, a etapa que evidencia este mecanismo é saída do álcool, que ocorre antes da entrada da água no sítio ativo.

1.2 Fotofísica

A radiação eletromagnética é assim chamada por ser composta por vetores de campo magnético e de campo elétrico. Estes vetores são oscilantes com o tempo e juntamente com o sentido de propagação da onda formam um sistema ortogonal. A energia dessa radiação (*E*) está associada frequência (*ν*) da oscilação dos campos, de acordo com a equação:

$$E = h\nu$$

Equação 7

onde h é a constante de Planck. A frequência é relacionada com o comprimento de onda (λ) de acordo com a equação:

$$\lambda = c/\nu$$

Equação 8

onde c representa a velocidade da luz no vácuo. O espectro eletromagnético é dividido em regiões de acordo com a energia da radiação e é classificado de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos tipos de radiação de acordo com a energia.

Tipo de Radiação	Energia (eV)	Comprimento de onda (nm)
Rádio	$> 10^{-5}$	$> 10^8$
Microondas	$10^{-5} - 0,01$	$10^6 - 10^8$
Infravermelho	$0,01 - 2$	$700 - 10^6$
Visível	$2 - 3$	$400 - 700$
Ultra-violeta	$3 - 10^3$	$1 - 400$
Raios-X	$10^3 - 10^5$	$10^{-2} - 1$
Raios Gama	$> 10^5$	$< 10^{-2}$

O diagrama de Jablonski, representado na Figura 7, é muito útil para a visualização dos processos fotofísicos. As linhas em negrito representam os estados eletrônicos: S_0 - estado fundamental da molécula; S_1 - primeiro estado singlete excitado; S_2 - segundo estado singlete excitado; T_1 - primeiro estado triplete excitado. As linhas estreitas representam os estados vibracionais excitados correspondentes ao respectivo nível eletrônico.

O processo de absorção é mais rápido frente aos outros, ocorre em torno de 10^{-15} s. Pela sua curta duração, a transição eletrônica é dita *vertical*: não ocorre o rearranjo dos núcleos atômicos. Este é o chamado *Princípio de Frank-Condon*. A absorção ocorre de acordo com a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon c [I]$$

Equação 9

onde A é a absorvância, ϵ o coeficiente de absorção molar, c o caminho óptico e $[I]$ a concentração da espécie absorvente. O coeficiente de absorção possui unidades de inverso da concentração vezes comprimento, uma vez que a absorvância é adimensional. Simplificando, o coeficiente adquire unidades de área por quantidade de matéria, o que expressa o quão eficiente é a espécie I para absorver luz.

Figura 7. Diagrama de Jablonski. Os níveis energéticos não estão em escala.

A emissão de fluorescência ocorre quando o elétron decai para seu estado eletrônico fundamental a partir do primeiro estado eletrônico excitado. Neste processo não ocorre mudança de multiplicidade entre os estados iniciais e finais. Esta mudança de multiplicidade pode ocorrer quando o estado eletrônico excitado possui a mesma energia que (está degenerado com) os níveis vibracionais do estado eletrônico triplete. Este é o chamado *Cruzamento Intersistemas* (ISC, do inglês *Intersystem Crossing*). À emissão de luz originada de um estado triplete dá-se o nome de *Fosforescência*. Os processos de fosforescência e fluorescência são ditos fenômenos radiativos, pois se dão pela emissão de um fóton (radiação). Mas o decaimento do estado eletrônico excitado para o estado

fundamental pode ocorrer pela desativação não-radiativa, que é a perda de energia por colisões do soluto com o solvente.

A espectroscopia de fluorescência como técnica analítica é vantajosa pela sua alta especificidade e alta sensibilidade. Porém existe a dificuldade de se encontrar sistemas químicos adequados, em que as propriedades ópticas (absorção e emissão) sejam bruscamente alteradas na conversão dos reagentes a produtos. Muitas vezes a alteração espectral é muito sutil, a ponto de a reação ser indistinguível para o equipamento.

1.3 Cromóforos

Os *cromóforos* são espécies químicas capazes de absorver radiação eletromagnética. Esta absorção ocorre quando a diferença entre dois níveis energéticos é igual à energia da radiação incidente. Os *fluoróforos* são cromóforos em que ocorre o fenômeno da fluorescência. No cromóforo a desativação do estado excitado ocorre majoritariamente por processos não radiativos. Nos fluoróforos a desativação pode ser considerada como uma soma das contribuições de processos radiativos (k_r) e não radiativos (k_{nr}), podendo-se definir assim uma nova grandeza, o *rendimento quântico de fluorescência* (Φ):

$$\Phi = \frac{k_r}{(k_r + k_{nr})}$$

Equação 10

O rendimento quântico é a medida da eficiência do processo de fluorescência, sendo ótimo quando o rendimento for unitário ($k_{nr} \ll k_r$), que corresponde à emissão de um fóton para cada fóton que foi absorvido pela molécula.

Além do rendimento quântico, têm-se outro parâmetro intrínseco aos cromóforos. O *tempo de vida* é definido utilizando-se as constantes de desativação e tem a forma matemática:

$$\tau_0 = \frac{1}{(k_r + k_{nr})}$$

Equação 11

O tempo de vida é um parâmetro que mostra o tempo médio de desativação (radiativa e não-radiativa) do estado excitado da molécula.

1.4 Antraquinonas

As antraquinonas constituem uma classe de substâncias aromáticas importantes na química de corantes, podendo-se modular suas propriedades de absorção e emissão de acordo com a posição e o tipo de substituinte (doador ou receptor eletrônico). Seus derivados estão presentes em diversos segmentos da indústria, como na produção de peróxido de hidrogênio (Campos-Martin, et al., 2006), no branqueamento de polpa de celulose. Na química medicinal, são utilizadas como sensibilizantes em radioterapia (Wardman, 2007), apresentam atividade larvicida (Cheng, et al., 2008), possuem também propriedades laxativas e antitumorais (Srinivas, et al., 2006).

1.4.1 Quinizarina

A quinizarina (1,4-diidroxi-antraquinona, Figura 8) apresenta o fenômeno de emissão de fluorescência porque suas ligações de hidrogênio intramoleculares aprisionam o par de elétrons não-ligante das carbonilas, o que estabiliza o nível $n-\pi^*$, impedindo o cruzamento intersistemas (Ahn, et al., 1998). A tautomeria ceto-enólica, causada pela transferência interna de próton (reação pericíclica através de rearranjo 1,5-sigmatrópico), permite a formação de 3 estruturas canônicas (Fain, et al., 2001), mostradas na Figura 8. A formação de um anel de 6 membros confere ao sistema um caráter

quasi-aromático, formado pelo sistema π da carbonila e do enol e do sistema σ da hidroxila e da ligação de hidrogênio.

Figura 8. Tautomeria ceto-enólica da quinizarina e ao final a representação canônica mostrando a ressonância dos anéis *quasi*-aromáticos.

Esta ligação de hidrogênio intramolecular confere à quinizarina um deslocamento batocrômico na sua banda de absorção não observado em seus isômeros de posição – a 2,6-diidróxi-antraquinona e a 1,2-diidróxi-antraquinona (Hovaneissian, et al., 2007).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos:

- ✦ Preparação de uma nova sonda diesterificada não fluorescente para ensaio cinético de lipase;
- ✦ Caracterização desta sonda por técnicas de espectroscopias na região do infravermelho, de absorção óptica e emissão de fluorescência, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, análise elementar;
- ✦ Caracterização fotofísica da quinizarina: cálculo do coeficiente de absortividade molar, emissão de fluorescência, medidas de tempo de vida do estado excitado;
- ✦ Verificação da ocorrência da reação de hidrólise da nova sonda pela enzima lipase utilizando como solvente *n*-hexano e decalina;
- ✦ Desenvolvimento de um modelo cinético para a reação em duas etapas sequenciais de hidrólise de um diéster.

Este sistema químico que emprega uma sonda diesterificada não-fluorescente que se torna um produto fluorescente após hidrólise enzimática é inédito na literatura. Também emergiu a necessidade da elaboração de um modelo cinético que leva em conta duas etapas de hidrólise sequenciais, considerando as etapas de interação com o catalisador (enzima).

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes

- ✦ 1,4-diidróxi-9,10-antracenodiona (Quinizarina) – Fluka®, 98%;
- ✦ Anidrido acético, Merck®, 98,5%;
- ✦ Novozym435, Novozymes® – enzima Lipase, fração B do fungo *Candida antarctica*, imobilizada por adsorção em partículas de poli(metil-metaacrilato) (PMMA) com diâmetro médio de 0,5 mm, teor de enzima 1-10% (m/m)².

3.2 Solventes

- ✦ Acetona, Aldrich®, 99,7%;
- ✦ Acetonitrila, Mallinckrodt®, 99,5%.
- ✦ Água, MilliQ®, 18,2 Mohms;
- ✦ Etanol anidro, J.T. Baker®, 99,6%;
- ✦ Dimetilformamida (DMF), J.T. Baker®, 99,97%;
- ✦ Dioxano, J.T. Baker®, 99,9%;
- ✦ *N*-hexano, Mallinckrodt®, 95%;
- ✦ Decalina (decaidronaftaleno), Across®, 98%;

Todo material foi utilizado sem purificação prévia.

3.3 Equipamentos

- ✦ Espectrofluorímetro Edinburgh CD900;
- ✦ Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu®;
- ✦ Banho de ultra-som Branson 1510;
- ✦ Espectrômetro Infravermelho Michelson;
- ✦ Ressonância Magnética Nuclear;
- ✦ Análise Elementar – CE Instruments, modelo EA 1110 – CHNS-O;
- ✦ Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® 4400;

² Dado informado pelo fornecedor (Novozymes).

4 MÉTODOS

4.1 Preparação da 1,4-diaceto-quinizarina

Para a preparação da 1,4-diaceto-quinizarina (DAQ), utilizou-se 100 mg de quinizarina em 1 mL de anidrido acético, catalisado por 1 gota de ácido sulfúrico P.A. A mistura foi mantida em banho ultra-som por 5 minutos. Neste processo, ocorreu a cavitação acústica, um processo em que há a formação de microbolhas no seio da solução com pressão e temperatura elevadíssimas, o que aumenta a velocidade de reação em algumas ordens de grandeza. Após isso, verteu-se a mistura em 20 g de gelo picado sob agitação, para a hidrólise anidrido acético excedente e a precipitação da DAQ. Em seguida foi realizada a filtração em funil de vidro sinterizado de porosidade média. Lavou-se o filtrado com porções de 50 mL de água Milli-Q® gelada e depois com etanol gelado. A secagem do filtrado foi feita em dessecador com sílica gel ativada e mantido com vácuo. O rendimento obtido foi de 55%. Esta síntese empregando ultra-som é mais rápida do que métodos encontrados na literatura e com um rendimento semelhante (Mahajan, et al., 2001). Um esquema da reação de síntese é representado na Figura 9.

Figura 9. Esquema da reação de síntese da DAQ.

4.2 Determinação da quantidade de enzima presente na Novozym435

A determinação da quantidade de enzima foi feita a partir da análise elementar do material. A enzima é constituída de carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e enxofre, enquanto que o material de suporte – polimetil metacrilato – é formado apenas por carbono, oxigênio e hidrogênio. Assim, sabendo-se a fração em massa de nitrogênio presente na enzima é possível determinar a porcentagem em massa de lipase presente na Novozym435 (todo nitrogênio presente na amostra está na enzima). Para isso, sabe-se que a lipase B possui 317 aminoácidos, cada um destes com um átomo de nitrogênio em suas respectivas ligações peptídicas. Adicionalmente, alguns aminoácidos também possuem nitrogênio em sua estrutura, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos aminoácidos nitrogenados presentes na Lipase B.

Nº de aminoácidos	Tipo de aminoácido	Nº de átomos de nitrogênio presentes na cadeia lateral
8	arginina	3
1	histidina	2
14	asparagina	1
18	glutamina	1
9	lisina	1
5	triptofano	1

Assim, há um total de 389 átomos de nitrogênio por enzima, o que corresponde a 16,5% em massa.

Esta mesma caracterização poderia ser feita utilizando-se como referência o enxofre, porém sua porcentagem em massa é muito pequena, uma vez que há apenas 6 átomos de enxofre por enzima encontrados na cisteína, ficando a massa absoluta de enxofre abaixo do limite de detecção do equipamento de análise elementar.

Na Figura 10 vê-se duas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Na maior ampliação (direita), observa-se pontos brancos que são aglomerados de enzimas.

Figura 10. Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura de uma partícula de Novozym435.

4.3 Ensaio de Hidrólise Enzimática

A reação global de hidrólise está representada na Figura 11.

Figura 11. Esquema da reação global de hidrólise, catalisado por lipase, da DAQ.

A reação foi realizada em cubeta de quartzo para fluorescência, com os seguintes componentes:

- ✚ DAQ, 160µM;
- ✚ Solvente (decalina ou *n*-hexano), 3 mL;
- ✚ Novozym435, 20 mg.

O uso de solvente saturado em água bem como a umidade presente no suporte polimérico e a hidratação da enzima fornecem a quantidade apropriada de água para ocorrência da reação.

O monitoramento espectroscópico foi feito em um espectrofluorímetro da Edinburgh Instruments, modelo CD 900, configurado de modo a medir espectros de emissão corrigidos no intervalo de 500 a 700 nm, com comprimento de onda de excitação de 480 nm (máximo de absorção da quinizarina) por contagem de fótons. O equipamento foi programado para medir um espectro a cada 5 minutos, durante aproximadamente 3 horas.

4.4 Fluorescência Resolvida no Tempo

Para os ensaios resolvidos no tempo utilizou-se o espectrofotômetro de resolução temporal de picossegundos construído no laboratório (Figura 12). A fonte de excitação é constituída de um sistema de laser de alta intensidade e pulsos ultra curtos. Este sistema compõe-se de um Laser Verdi/Coherent 5W (laser auxiliar) que bombeia um segundo laser, de Ti-Safira (Coherent Mira Modelo XW - laser principal) gerando pulsos de 200 fs na região de 700 - 900 nm. Utilizando-se de um dobrador de frequência para geração de segundo harmônico (SHG), obtêm-se pulsos para excitação com comprimento de onda na região de 350 - 450 nm (Pereira, et al., 2006; Pereira, et al., 2006; Oliveira, et al., 2006, 2003). A detecção por contagem de fótons é realizada por um placa de micro-canais (MCP-PMT Hamamatsu R3809U-90) e a sincronização da frequência de pulsos de excitação é medida com um fotodiodo ultra-rápido TDA 200 da PicoQuant GmbH. O registro dos histogramas de decaimento é realizado por eletrônica discriminador/TAC do módulo TCC-900 da Edinburgh Instruments.

Figura 12. Planta baixa da instrumentação utilizada para as medidas resolvidas no tempo.

4.4.1 Contagem de Fótons

A técnica de contagem de fóton (TCF) é um método instrumental estatístico utilizado no monitoramento de decaimentos de fluorescência para a obtenção de informações sobre as espécies moleculares. A partir da análise dos resultados obtidos determinam-se os tempos de vida, sua distribuição ou parâmetros de modelos cinéticos. Por exemplo, o tempo de vida (τ) pode ser usado matematicamente em conjunção com outros parâmetros determinados experimentalmente, tal como rendimento quântico (Φ), para derivar considerações relacionadas ao estado excitado. Esta informação é útil no entendimento do mecanismo dos processos de excitação e desativação. Os tempos de vida fornecem, ainda, informações adicionais para ajudar na caracterização de moléculas e interações moleculares.

O princípio desta técnica baseia-se no conceito de que a distribuição de probabilidade de emissão de um fóton, após o evento de excitação da amostra, é proporcional à distribuição de intensidade de luminescência no tempo para os fótons emitidos como resultado da excitação da amostra. Através da contagem sucessiva de fótons correlacionados no tempo, pode-se construir um histograma que representa esta probabilidade de distribuição. Desta forma, cada contagem individual de fóton detectado deve estar vin-

culado no máximo a um pulso de excitação, sendo o histograma resultado da acumulação de um grande número de pulsos de excitação da amostra.

A medida dos tempos de vida é realizada excitando a amostra com uma fonte de luz pulsada, de forma que, após cada pulso de excitação, apenas um único fóton - emitido pela amostra - é detectado. Já o decaimento da intensidade de fluorescência é adquirido acumulando-se um grande número de contagens – geralmente utiliza-se aproximadamente 5000 contagens de pico como padrão.

Figura 13. Fotografia dos equipamentos instalados no Grupo de Fluorescência Molecular. À esquerda está a aparelhagem para a fluorescência resolvida no tempo e à direita o Microscópio Confocal de Fluorescência.

Para calcular o decaimento de fluorescência é usada a análise de reconvolução. Este procedimento envolve a convolução do modelo teórico, que representa a cinética

dos dados medidos como uma função de resposta instrumental (IRF) e, em seguida, a comparação desse resultado com dados do decaimento da amostra em questão.

A função de decaimento de luminescência, simulada por convolução entre a resposta instrumental $irf(t)$ e a resposta da amostra $f(t)$, pode ser representada pela equação:

$$D(t) = \int_0^t irf(t)f(t - t')dt$$

Equação 12

onde $f(t)$ é a função de decaimento, que também pode ser expressa por uma exponencial ou pela soma das exponenciais de decaimentos, como mostra a equação:

$$f(t) = Ae^{-t/\tau}$$

Equação 13

Na reconvolução, os parâmetros em $f(t)$ são variados a fim de minimizar χ^2 , que é a soma dos quadrados ponderados dos resíduos - desvio ponto a ponto entre as curvas de decaimento experimental ($Y(t)$) e calculado ($D(t)$):

$$\chi^2 = \sum_{i=n_1}^{n_2} \frac{[Y(t) - D(t)]^2}{Y(t)}$$

Equação 14

onde, n_1 e n_2 correspondem ao primeiro e ao último pontos da região de análise.

Se os dados são ajustados com precisão, então, a razão entre os desvios real e esperado será igual à unidade. Isto significa dizer que há um bom ajuste quando $\chi^2 \cong 1$.

O processo de detecção temporal ocorre da seguinte forma: o pulso de excitação da fonte de luz é repartido de modo que um feixe vai para o fotodiodo (PD) e o outro para a amostra. Ao receber uma fração do pulso do laser, PD produz um sinal elétrico que, por intermédio de um discriminador de sinal de partida (D1) inicia o processo de carregamento do capacitor de um conversor amplitude-tempo (TAC, Figura 14). Simultaneamente ocorre a excitação da amostra a partir do mesmo pulso de luz. As moléculas

da amostra estão excitadas e passam a sofrer um decaimento radiativo e essa emissão é detectada pelo MCP-PMT. O pulso de um único fóton, após amplificação e discriminação (D2), é utilizado para cessar o carregamento do TAC. A diferença de potencial no capacitor é diretamente proporcional ao tempo entre o evento da excitação e a detecção do primeiro fóton. Esse processo é ilustrado na Figura 12. Este sinal elétrico de amplitude definida é enviado a um analisador de múltiplos canais (MCA), onde é armazenado como uma contagem.

A repetição deste procedimento para um elevado número de pulsos de excitação sobre a amostra resulta na acumulação de um histograma do número de contagens em função dos endereços de memória do MCA, ou seja, o processo é continuado até que um número suficiente de contagens tenha sido coletado no MCA para a definição de uma curva de decaimento de fluorescência.

Figura 14. Conversão amplitude-tempo em um TAC.

4.5 Microscopia de Fluorescência Confocal

A técnica de microscopia confocal de fluorescência permite obter informações sobre sistemas fluorescentes em escala micro- nanoscópica, aliando a sensibilidade da técnica de fluorescência com o poder de ampliação do microscópio óptico . Para tais

medidas, o equipamento utilizado foi construído no próprio grupo de pesquisa e tem como base um microscópio da marca Olympus, modelo IX71. A excitação da amostra é feita pela porta de epifluorescência do microscópio na qual é colocado um posicionador XY do focalizador de fibra óptica que direciona o feixe de laser 532 nm de onda contínua (Verdi operando em baixa intensidade, 50 mW) até o suporte da amostra.

Figura 15. Planta baixa da instrumentação: FN = Filtro de Notch, BS = separador de feixes (dicróico).

XYZ = nanoposicionador, APD = Fotodiodo Avalanche, IX71 = microscópio invertido, PC = microcomputador.

A observação da emissão de fluorescência é feita utilizando-se uma objetiva com elevada abertura numérica (Olympus 60X com NA=1.35). Com uma combinação apropriada de espelho dicróico e filtros de luz, as amostras são monitoradas em um nanovolume de excitação.

O sinal de emissão das amostras obtido no IX71 é medido através de sua porta lateral esquerda onde têm-se um sistema óptico de filtros (tipo Notch de banda estreita de alta densidade óptica $OD > 6$ para evitar qualquer mínimo sinal de excitação e de

espalhamento), um *pinhole* de 80 μm centrado pelo uso de um posicionador xy e z, lentes, íris, e detectores de fótons, mostrados na Figura 16.

Figura 16. Fotografia da sequência de filtros e detectores utilizados.

A detecção por contagem de fótons utiliza por um detector pontual do tipo APD (fotodiodo tipo avalanche da marca EG&G Optoelectronics modelo SPCM-AQ-161-FC), que possui baixo ruído de fundo (contagem de escuro < 100 cps), e uma resposta espectral na região de 430 – 850 nm.

Os sinais TTL dos detectores são enviados a um analisador de múltiplos canais (MCA-Tenenelec/Oxford), que registra os histogramas de contagem de fótons operando em modo MCS. Um esquema simplificado da instrumentação é mostrado na Figura 15.

Para se realizar o experimento, foi utilizada uma forma de poliacetal personalizada, manufaturada junto à Oficina Mecânica do IQSC. Esta forma foi colada sobre

uma lamínula própria para microscopia. Na Figura 17 está a forma em suas projeções superior e isométrica. A forma é constituída de um orifício central da ordem de 2 mm em sua parte inferior e 5 mm em sua parte superior, sendo a solução contendo o diéster adicionada neste poço formado. Há também um rebaixo na parte superior da peça para que se fixe uma segunda lamínula, ligeiramente menor que a primeira, de modo a ser retardada a evaporação do solvente.

Figura 17. Projeção da forma utilizada. À esquerda está representada a vista superior e à direita está a vista isométrica.

Os experimentos foram conduzidos adicionando-se uma esfera de Novozym435 no orifício central da forma juntamente com algumas gotas de solução de DAQ de concentração da ordem de nanomolar (10^{-9}). O sistema foi recoberto com a segunda lamínula e posicionado ao microscópio para serem efetuadas as medidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da DAQ

5.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho

São apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho referentes à quinizarina (Figura 18) e à DAQ (Figura 19). As amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro. O deslocamento das bandas em 1590 e 1630 cm^{-1} (carbonila) da Figura 18 para 1667 e 1776 cm^{-1} da Figura 19 evidencia que ocorreu a quebra das ligações de hidrogênio intramoleculares. Há também a alteração da banda de estiramento C-O de 1254 cm^{-1} na quinizarina para 1190 cm^{-1} na DAQ (Pavia, et al., 2001)(Silverstein, et al., 2006).

Figura 18. Espectros de absorção na região de Infravermelho da Quinizarina.

Nota-se que a banda relativa à hidroxila aparece atenuada, devido ao sistema possuir duas ligações de hidrogênio intramolecular, que causa dois efeitos: o primeiro

reduz a constante de ligação entre o hidrogênio e o oxigênio da hidroxila e o segundo é a compensação do momento de dipolo dada pela simetria da molécula.

Tabela 3. Relação dos picos principais do espectro de absorção na região do IV da quinizarina e sua relação estrutural.

Número de onda (cm^{-1})	Correspondência estrutural – tipo de deformação
3450	Hidroxila - axial
1630	Carbonila - axial
1590	Carbonila - axial
1255	C-O - axial
1211	C-O - axial
790	C-O - angular

Figura 19. Espectro de absorção na região do infravermelho da DAQ.

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

A caracterização por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{HMRN}$) está representada nas Figura 20 e Figura 21. A Figura 20 é o espectro de quinizarina, onde é possível notar o pico em $\delta = 12,9$ ppm, correspondente ao próton da hidroxila, este

que não está presente na Figura 21, que corresponde à DAQ. Na Figura 21 nota-se um pico em 2,3 ppm oriundo das metilas do grupo acetil, o que evidencia novamente que a síntese foi bem sucedida. Os picos entre 7 e 9 ppm são relativos aos hidrogênios ligados ao anel aromático (antraceno), presentes tanto na quinizarina quanto na DAQ.

Figura 20. Espectro obtido por RMN de próton de quinizarina em CDCl₃.

Figura 21. Espectro obtido por RMN de próton de DAQ em CDCl₃.

5.2 Absorção e fluorescência

Os espectros de absorção óptica da quinizarina (vermelho, contínuo) e da DAQ (preto, tracejado) são apresentados na Figura 22. Ambos os espectros foram medidos

em *n*-hexano e a 25°C. O deslocamento ipsocrômico se dá pela quebra das ligações de hidrogênio intramoleculares da quinizarina, o que desestabiliza os pares de elétrons das carbonilas. Este deslocamento é observado na 2-6-diidróxi-antraquinona (ácido antraflávico), isômero posicional da quinizarina que não apresenta as ligações intramoleculares de hidrogênio (Bernede, et al., 1995). No espectro da quinizarina ainda pode-se atribuir as bandas aos seus tautômeros relacionados na Figura 8 – o pico em 480 nm ao tautômero I, o pico em 504 nm ao III e o pico em 517 nm ao II (Fain, et al., 2001).

Figura 22. Espectros de absorção. DAQ (tracejado) e quinizarina (linha contínua).

Na Figura 23 estão apresentados os espectros de emissão de fluorescência da quinizarina (contínua, laranja, com $\lambda_{ex} = 480$ nm) e DAQ (tracejada, preta, com $\lambda_{ex} = 340$ nm). Nota-se que a quinizarina apresenta uma emissão de fluorescência muito maior que a DAQ e com essa diferença espectral é possível detectar fluorimetricamente apenas o produto da reação de hidrólise.

Figura 23. Espectros de Emissão da quinizarina (linha contínua) e de seu derivado DAQ (tracejado).

5.3 Coeficiente de absortividade molar

Foram determinados os coeficientes de absortividade molar da quinizarina e da DAQ em seus respectivos máximos de absorção. Para isso foram medidos espectros de absorção com diferentes concentrações de analito e aplicando a lei de Lambert-Beer (Equação 9), com um gráfico de absorbância por concentração, faz-se a regressão linear, considerando o caminho óptico de 1 cm, o coeficiente angular obtido corresponde ao coeficiente de absortividade molar.

5.3.1 Quinizarina

Os espectros de absorção da quinizarina em diferentes concentrações são apresentados na Figura 24. Os valores de absorbância correspondentes à cada concentração estão apresentados na forma de gráfico na Figura 25.

Figura 24. Espectros de absorção da quinizarina em *n*-hexano em diferentes concentrações.

Figura 25. Gráfico de absorbância vs. concentração de quinizarina.

O coeficiente angular obtido pela regressão linear da Figura 25 resultou em um valor de coeficiente de absortividade molar da quinizarina em $\lambda = 484 \text{ nm}$ de $7616 \pm 500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com um valor de mínimos quadrados de 0,990.

5.3.2 DAQ

Os dados relativos ao cálculo do coeficiente de absortividade molar da DAQ estão apresentados nas Figura 26 e Figura 27. Na primeira constam os espectros de absorção óptica da DAQ em diferentes concentrações enquanto que na segunda está o gráfico de absorbância vs. concentração.

Figura 26. Espectros de absorção de DAQ em *n*-hexano em diferentes concentrações.

Figura 27. Gráfico de absorbância vs. concentração de DAQ.

Desta forma, o valor do coeficiente de absorvidade molar encontrado da DAQ em $\lambda = 325 \text{ nm}$ é de $3807 \pm 45 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com um valor de mínimos quadrados de 0,999. O ajuste foi considerado muito bom.

5.4 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

Medidas com resolução temporal para o estado eletrônico excitado de quinizarina foram realizadas nos seguintes solventes: decalina, cicloexano e *n*-hexano. Nota-se que o tempo de vida médio do estado excitado aumenta de acordo com a viscosidade do solvente, isto devido à atenuação da desativação não-radiativa, que ocorre pela colisão do fluoróforo com o solvente.

Figura 28. Gráfico de decaimento da quinizarina realizado em decalina: em verde a função de resposta instrumental, em preto o dado obtido experimentalmente e em azul o ajuste teórico.

Figura 29. Gráfico de decaimento da quinizarina realizado em *n*-hexano: em verde a função de resposta instrumental, em preto o dado obtido experimentalmente e em azul o ajuste teórico.

Figura 30. Gráfico de decaimento da quinizarina realizado em cicloexano: em verde a função de resposta instrumental, em preto o dado obtido experimentalmente e em azul o ajuste teórico.

Tabela 4. Tempos de vida da quinizarina em diferentes solventes orgânicos.

Solvente	Tempo de vida médio (ns)	Chi-sqr	Literatura
Decalina	2,36	1,163	-
cicloexano	2,32	1,094	2,38(Palit, et al., 1990)
<i>n</i> -Hexano	2,26	1,073	-

5.5 Determinação da quantidade de enzima presente na Novozym435

Considerando X o percentual de enzima na amostra, a massa de nitrogênio medida no sistema corresponde à $0,165X$. Assim, dividindo-se o percentual de nitrogênio medido por $0,165$, encontra-se um valor de **7,15%** (m/m) de enzima nas partículas de Novozym435.

Tabela 5. Percentual em massa dos elementos C, H e N de uma amostra de Novozym435.

Amostra	Nitrogênio	Carbono	Hidrogênio
I	1,24	66,75	8,55
II	1,12	66,76	8,53
média	1,18	66,76	8,54

5.6 Modelo Cinético

A hidrólise enzimática do derivado de quinizarina ocorre em duas etapas sequenciais, pois o sítio ativo da enzima acomoda apenas um éster por ciclo catalítico. Um modelo cinético que descreve esta reação é descrito como:

Figura 31. Esquema de reações para o modelo cinético de hidrólise em duas etapas consecutivas.

Figura 32. Representação das estruturas apresentadas na Figura 31.

Na Figura 31, S_2 corresponde ao diéster, S_I ao monoéster, S_0 à quinizarina - suas estruturas químicas são apresentadas na Figura 32 - E é a enzima, (ES_2) é o complexo enzima-substrato formado pelo diéster e (ES_I) o complexo formado com o monoéster.

As equações de velocidade para cada espécie são descritas como:

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_2S_2E + k_{-2}(ES_2)$$

Equação 15

$$\frac{d(ES_2)}{dt} = k_2S_2E - (k_{-2} + k_{c2})(ES_2)$$

Equação 16

$$\frac{dS_1}{dt} = -k_1S_1E + k_{-1}(ES_1) + k_{c2}(ES_2)$$

Equação 17

$$\frac{d(ES_1)}{dt} = k_1S_1E - (k_{-1} + k_{c1})(ES_1)$$

Equação 18

$$\frac{dS_0}{dt} = k_{c1}(ES_1)$$

Equação 19

$$\frac{dE}{dt} = -k_2S_2E - k_1S_1E - (k_{-2} + k_{c2})(ES_2) - (k_{-1} + k_{c1})(ES_1)$$

Equação 20

Antes de se resolver analiticamente este sistema de equações diferenciais foi realizado uma simulação dos valores das concentrações das espécies S_2 , S_1 e S_0 , sendo o resultado apresentado na Figura 33.

Figura 33. Simulação da hidrólise. Em preto S_2 , em azul S_1 e em vermelho S_0 .

Para resolver este sistema de equações diferenciais ordinárias de primeira ordem primeiramente supõe-se o estado estacionário (Li, et al., 2008) para os intermediários (ES_2) e (ES_1), o que resulta nos seguintes valores:

$$(ES_2) = \frac{k_2 S_2 E}{k_{-2} + k_{c2}}$$

Equação 21

$$(ES_1) = \frac{k_1 S_1 E}{k_{-1} + k_{c1}}$$

Equação 22

Substituindo o valor de (ES_2) na Equação 15, obtemos a expressão

$$\frac{dS_2}{dt} = -\alpha S_2$$

Equação 23

Sendo $\alpha = \frac{k_2 k_{c2} E}{k_{-2} + k_{c2}}$. Integrando-se a equação diferencial, obtém-se:

$$S_2(t) = S_2^0 e^{-\alpha t}$$

Equação 24

Para se obter o valor de S_1 , substituem-se as Equação 21 e Equação 22 na Equação 17, obtendo-se:

$$\frac{dS_1}{dt} = \alpha S_2 - \beta S_1$$

Equação 25

Sendo $\beta = \frac{k_1 k_{c1} E}{k_{-1} + k_{c1}}$. Com a condição inicial $S_1(0) = 0$, a Equação 25 é resolvida utilizando o teorema da convolução³:

$$S_1(t) = \alpha S_2(t) \otimes e^{-\beta t}$$

Equação 26

Assim, substituindo-se o valor de $S_2(t)$ pela Equação 24 obtêm-se o valor de $S_1(t)$:

$$S_1(t) = \frac{\alpha S_2^0}{\alpha - \beta} (e^{-\beta t} - e^{-\alpha t})$$

Equação 27

Finalmente, para encontrar o valor de $S_0(t)$, substitui-se a Equação 22 na Equação 19, e o valor $S_1(t)$ pela Equação 27, o que resulta:

$$S_0(t) = \beta \int_0^t S_1(\tau) d\tau$$

Equação 28

Esta expressão, que integrada, resulta em:

$$S_0(t) = \frac{S_2^0}{\alpha - \beta} [\alpha(1 - e^{-\beta t}) + \beta(e^{-\alpha t} - 1)]$$

Equação 29

Esta equação foi utilizada inicialmente para ajustar os dados experimentais de hidrólise, mas o ajuste resultou valores idênticos para as constantes α e β . Segundo a Equação 29, isso é uma inconsistência, pois resulta em uma divisão por zero. Desta forma, a resolução algébrica do modelo foi remodelada, de forma a considerar as constantes α e β iguais. A Equação 26 torna-se então:

³ O símbolo $\otimes$ representa a integral de convolução, definida por
 $f(t) \otimes g(t) = \int f(\tau)g(t - \tau)d\tau$

$$S_1(t) = \alpha S_2(t) \otimes e^{-\alpha t}$$

Equação 30

E sua solução final:

$$S_1(t) = \alpha S_2^0 t e^{-\alpha t}$$

Equação 31

O resultado da Equação 19 surge substituindo a Equação 31 e integrando-a, sendo expressa da seguinte forma:

$$\frac{S_0(t)}{S_2^0} = 1 - (at + 1)e^{-at}$$

Equação 32

sendo $S_2^0 = S_2(0)$.

Ao expressar a constante α em função da constante de Michaelis-Menten K_m encontra-se a seguinte relação:

$$\alpha = \frac{k_{cat} E}{K_m}$$

Equação 33

Esta expressão é a eficiência catalítica da enzima, sendo ótima quando se aproxima do limite de difusão (10^6 M s^{-1}). Isso significa que a enzima converte o substrato em produto tão logo quanto o encontra em solução.

Realizou-se a simulação desta equação utilizando-se erros randômicos de ± 1 , ± 5 e $\pm 10\%$, conforme mostrados na Figura 34.

Figura 34. Simulação da hidrólise de quinizarina com erro aleatório. No topo o erro simulado foi de 1%, no meio, 5% e embaixo, 10%.

Os parâmetros utilizados foram $\alpha = 4,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Vemos que as curvas simuladas com erro se ajustam com um erro mínimo à equação original, expressa em vermelho na Figura 34.

Ao se realizar os experimentos utilizando decalina como solvente o perfil da produção de quinizarina não se apresentou como uma curva sigmoidal, indício de que a Equação 34 bem como o modelo cinético proposto não se adequavam à realidade do sistema para este caso particular. Assim, um novo modelo cinético, mais adequado, foi desenvolvido. A diferença desta formalização para a anterior está na etapa de formação do monoéster, que no primeiro caso é assumido que esta espécie deixa a enzima e vai para a solução, e somente após esta saída o monoéster retorna à enzima para ser hidrolisado novamente, enquanto que neste segundo modelo supõe-se que S_1 , quando formado na primeira etapa, não se distancia da enzima, o que favorece uma rápida formação de (ES_1) e a subsequente hidrólise para a formação de S_0 .

O fato experimental que levou à elaboração deste modelo foi o perfil de produção de S_0 em decalina, que não mostrou uma tendência sigmoidal. Este perfil sigmoidal se dá pela formação e acúmulo do monoéster em solução. Enquanto a concentração de S_1 é crescente a concavidade da curva de S_0 é para cima e após a concentração de S_1 atingir seu máximo (o que corresponde ao ponto de inflexão da curva de S_0) a concavidade de S_0 volta-se para baixo. Desta forma, a suposição de que S_1 não se acumula em solução (ou seja, é formado o complexo (ES_1) com a enzima a partir de (ES_2)) parece bastante razoável.

Este modelo é apresentado da seguinte forma:

Figura 35. Modelo cinético proposto para a produção de quinizarina em decalina.

Diante deste esquema reacional, as equações diferenciais de velocidade das espécies envolvidas tomam a seguinte forma:

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_2ES_2 + k_{-2}(ES_2)$$

Equação 34

$$\frac{d(ES_2)}{dt} = k_2ES_2 - (k_{-2} + k')(ES_2)$$

Equação 35

$$\frac{d(ES_1)}{dt} = k'(ES_2) - k_{c1}(ES_1)$$

Equação 36

$$\frac{dS_0}{dt} = k_{c1}(ES_1)$$

Equação 37

$$\frac{dE}{dt} = -k_2ES_2 + k_{-2}(ES_2) + k_{c1}(ES_1)$$

Equação 38

A nomenclatura utilizada neste modelo segue da mesma forma que o modelo anterior, com a adição da constante k' que representa a conversão do complexo enzima-substrato (ES_2) para (ES_1).

Para se resolver o sistema de equações diferenciais do modelo proposto, novamente supõe-se o estado estacionário para os complexos enzima-substrato, que assume assim a forma:

$$(ES_2) = \frac{k_2S_2E}{k_{-2} + k'}$$

Equação 39

$$(ES_1) = \frac{k'k_2S_2E}{(k_{-2} + k')k_{c1}}$$

Equação 40

Para resolver a Equação 34, substitui-se a Equação 39 e integra-se, obtendo a seguinte expressão:

$$S_2(t) = S_2^0 e^{-\alpha' t}$$

Equação 41

sendo $\alpha' = \frac{k'k_2E}{(k_{-2}+k')}$. Substituindo a Equação 40 na Equação 37, obtêm-se:

$$\frac{dS_0}{dt} = \alpha' S_2$$

Equação 42

Assim, substituindo a Equação 41 na Equação 42 e integrando a expressão resultante, têm-se:

$$\frac{S_0(t)}{S_2^0} = (1 - e^{-\alpha' t})$$

Equação 43

Nota-se que a produção de S_0 neste caso segue um perfil monoexponencial e que a função independe da constante k_{c1} . A produção de quinizarina neste caso segue de acordo com a lei de Michaelis-Menten, sendo a hidrólise realizada em apenas uma etapa, em contraste com o primeiro modelo em que a hidrólise é realizada em duas etapas sequenciais.

5.6.1 Cinética de hidrólise

Nos ensaios iniciais de hidrólise, necessários para a verificação da factibilidade da ação enzimática sobre o substrato diesterificado o solvente utilizado foi água MilliQ. Nesta condição não foi possível obter sinal de fluorescência pelo espectrofluorímetro, mas a ocorrência da reação foi verificada pelo surgimento da coloração alaranjada nas partículas de suporte da enzima. Esta coloração é característica da quinizarina, que é insolúvel em água e permaneceu aderida na superfície da partícula de suporte, composta

de poliacrilato. A Figura 36 mostra à esquerda as partículas de Novozym435 antes da reação e à direita as mesmas esferas após a reação, com aspecto alaranjado.

Figura 36. Fotografia da enzima suportada antes (esquerda) e depois (direita) da reação.

Assim, foi necessária a utilização de um solvente capaz de solubilizar a quinizarina, mas que não inibisse a atividade enzimática. O solvente encontrado que contempla estes quesitos foi *n*-hexano⁴ e posteriormente foi utilizado também decalina, que também se mostrou capaz de solubilizar a quinizarina formada e incapaz de inibir a atividade enzimática.

Na Figura 37 são apresentados os espectros de quinizarina proveniente da hidrólise da DAQ, realizados em *n*-hexano. A concentração de DAQ utilizada foi de 160 μM e a massa de Novozym435 foi de 22,1 mg. Nota-se que há um aumento da fluorescência com o tempo, o que evidencia a ocorrência da reação. Cada espectro da Figura 37 foi integrado e com o valor de cada integral foi montado um gráfico de intensidade de fluorescência *vs.* tempo, este apresentado na Figura 38. A partir deste último gráfico, utilizou-se a Equação 32 para se fazer o ajuste dos dados experimentais e se obter o parâmetro cinético α . Seu valor encontrado foi de $(4,70 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e o valor dos residuais dos mínimos quadrados foi de 0,9998, considerado muito bom.

⁴ A sugestão para a utilização deste solvente partiu do Prof. Dr. André L. de M. Porto, durante a apresentação de uma prévia deste trabalho na etapa equivalente à qualificação de mestrado.

Figura 37. Acompanhamento da hidrólise enzimática da DAQ realizado em *n*-hexano.

Figura 38. Gráfico da intensidade de fluorescência vs. tempo. Os círculos representam os dados experimentais e a linha contínua o ajuste pela Equação 32.

Os dados obtidos pela hidrólise enzimática realizada em decalina como solvente são apresentados na Figura 39. A concentração utilizada de DAQ foi de 150 μM e a massa de enzima utilizada foi 22,2 mg. O ajuste dos dados foi realizado utilizando-se a Equação 43, o que resultou em um valor de α' de $(1,70 \pm 0,08) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. O valor de mínimos quadrados para este ajuste foi de 0,997, considerado bom.

Figura 39. Gráfico da intensidade de fluorescência vs. tempo. Os círculos representam os dados experimentais e a linha contínua o ajuste pela Equação 43

5.7 Microscopia Confocal de Fluorescência

Os dados relativos aos experimentos utilizando a técnica de Microscopia Confocal de Fluorescência são apresentados a seguir. A aquisição de dados foi feita utilizando-se 10 ms de incremento de tempo e uma janela de 4096 canais do sistema de detecção (MCA - Multiport Tenelec - Oxford).

Figura 40. Histograma de contagem de fótons com incremento de tempo de 10 ms.

Na Figura 40 está apresentado um histograma típico de contagem de fótons dos primeiros 1000 canais para melhor visualização. O traço em vermelho representa o limite escolhido entre a atividade enzimática somada à contagem de fundo (flutuações da concentração de fluoróforo no elemento de volume de excitação) e a partir deste limite faz-se uma estatística de contagem do tipo ligado-desligado (*on-off*) da seguinte forma: o canal que tiver um número de contagens acima do limite estabelecido é atribuído um valor 1 (*on* - que representa a formação de quinizarina seguida da emissão de fluorescência) e os que tiverem abaixo recebem valor 0 (*off*). Assim, esse primeiro tratamento gera o histograma *on-off* mostrado na Figura 41.

Figura 41. Histograma *on-off* dos 120 primeiros canais.

A partir deste histograma de contagens *on-off* é feita uma estatística de contagem *off* da seguinte forma: mede-se o tempo entre duas contagens positivas (*on*) primeiramente com intervalo de tempo de 10 ms (101), seguido por 20 ms (1001), 30 ms (10001) e assim sucessivamente e acumula-se o número de contagens sobre um novo histograma, mostrado na Figura 42.

Figura 42. Histograma de tempo *off*.

O tempo médio da relaxação obtido do histograma de frequências *off* é de aproximadamente 35 ms. Este valor depende do volume de reação observado e da concentração local de substrato DAQ. A relação entre este valor obtido do histograma de contagem e o valor médio de alfa não é direta em vista que as concentrações usadas bem como os volumes de reação observados são diferentes.

6 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho pode-se concluir que a síntese do derivado diacetilado da quinizarina (DAQ) empregando o banho de ultra-som é mais eficiente e rápido que o método que emprega alta temperatura (Mahajan, et al., 2001). Foi verificado também que este derivado não apresenta fluorescência, o que viabiliza o monitoramento da reação de hidrólise enzimática por espectroscopia de fluorescência.

A reação de hidrólise do derivado diacetilado da quinizarina mediada pela enzima lipase foi factível, esta que foi acompanhada por espectroscopia de fluorescência. A partir do modelo teórico desenvolvido, que leva em consideração duas etapas sequenciais de hidrólise, foi possível obter a constante cinética global envolvida no processo. Esta constante é a combinação linear das constantes envolvidas nos processos elementares, e sua relação com a constante de Michaelis-Menten é expressa na Equação 33. Assim, o modelo se mostrou eficiente para o ajuste dos dados experimentais, confirmado pelo baixo valor de desvio pelo método dos mínimos quadrados.

O segundo modelo proposto, desenvolvido para ajustar os dados de hidrólise realizados em decalina como solvente, também se mostrou eficiente para o ajuste dos dados nesta condição, uma vez que o residual dos mínimos quadrados foi próximo da unidade. Como se trata de uma abordagem nova de hidrólise enzimática, nenhum artigo na literatura apresenta as constantes conforme o modelo apresentado, o que impossibilitou a comparação com valores de referência.

Este trabalho foi precursor dentro da linha de pesquisa que está em fase final de implementação no Grupo de Fluorescência Molecular do Instituto de Química de São Carlos. Esta linha de pesquisa tem como objetivo estudar a cinética enzimática com o auxílio da microscopia de fluorescência, até o ponto de se medir a atividade de uma

única enzima. Esta técnica é conhecida como *Single Molecule Spectroscopy* e é o resultado da fusão das técnicas de microscopia e de fluorescência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K.D.; KIM J.M.; KANG J.H.; HAN D.K.; LEE C.W. A novel precursor for color and fluorescence imaging. *Chem. Matter.* v. 10, p. 2332-2334, 1998.

BERNEDE, J.C.; BEN NASRALLAH T.; JAMALI M.; MEVELLEC J.Y.; RABILLER C.; PROUTIERE A. Is a hydrogen bond responsible for the optical properties of some dihydroxyanthraquinones: quinizarin and anthraflavic? *J. Phys. Chem. Solids.* V. 56, p. 1239-1251, 1995.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations.** Weinhein : Wiley-VCH, 2005. 355 p.

CAMPOS-MARTIN, J.M.; BLANCO-BRIEVA, G.; FIERRO, J.L.G. Hydrogen peroxide synthesis: an outlook beyond the anthraquinone process. *Angew. Chem. Int. Ed.* V. 45, p. 6962-6984, 2006.

CHENG, S.S; HUANG, C.G.; CHEN, W.J.; KUO, Y.H.; CHANG, S.T. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. *Biores. Tech.* V. 99, p. 3617-3622, 2008.

CHIOU, S.Y.; CHIOU, S.Y.; CHENG, Y.R.; LU, C.P.; LIN, Y.F.; LIN, L.Y.; LIN, G. Kinetics and quantitative structure-activity relationships for pseudomonas sp. lipase-catalyzed hydrolysis of both monoesters and diesters of ethylene glycol. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* V. 83, p. 201-206, 2006.

CHRISTENSEN, M.W.; ANDERSEN, L.; HUSUM, T.L.; KIRK, O. Industrial enzyme immobilization. *Europ. J. of Lip. Sci. Tech.* V. 105, p. 318-321, 2003.

FAIN, V. Ya., ZAITSEV, B.E.; RYABOV, M. A. Electronic absorption spectra and tautomerism of quinizarin and its substituted derivatives. *Rus. J. Gen. Chem.* V. 73, p. 1688 – 1695, 2001.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR. hydrophobic, electronic and steric constants.** New York: ACS, 1995. 348 p.

HOVANEISSIAN, M.; ARCHIER, P.; VIEILLESCHAZES, C. Influence of cetophenolic and diphenolic intramolecular hydrogen bonding on the chromatographic and spectroscopic properties of hydroxyanthraquinones. *Dyes and Pig.* V. 74, p. 706-712, 2007.

LI, B., SHEN, Y.; LI, B. Quasi-steady-state laws in enzyme kinetics. *J. Phys. Chem. A.* V. 112, p. 2311-2321, 2008

MAHAJAN, A.; BEDI, R. K.; PRAMILA; KUMAR, S. Characterization of thermally evaporated 1,8-diacetoxy-9,10-anthraquinone films. *Thin Sol. Films.* V. 398-399, p. 82-86, 2001.

- MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enz. and Microb. Tech.* V. 40, p. 1451-1463, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2005. 1117 p.
- OLIVEIRA, H. P. M.; GEHLEN, M. H. Electronic energy transfer between fluorescent dyes with inter and intramolecular interactions. *Chem. Phys.* V. 290, p. 85 – 91, 2003.
- OLIVEIRA, H. P. M.; GEHLEN, M. H. Time-resolved fluorescence of cationic dyes covalently bound to poly(methacrylic acid) in rigid media. *J. Luminescence.* V. 121, p. 544 – 552, 2006.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enz. and Microb. Tech.* V. 27, p. 187 – 204, 2000.
- PALIT, D.K.; PAL, H.; MUKHERJEE, T.; MITTAL, J.P. Photodynamics of the S1 state of some hydroxy- and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *J. Chem. Soc. Far. Trans.* V. 86, p. 3861-3869, 1990.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3^a ed. New York: Thomson Learning, 2001.
- PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. Photoinduced intramolecular charge transfer in 9-aminoacridinium derivatives assisted by intramolecular H-bond. *J. Phys. Chem. A.* V. 110, p. 7539 – 7546, 2006.
- PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. H-bonding assisted intramolecular charge transfer in 1-aminopyrene derivatives. *Chem. Phys. Letters.* V. 426, 4-6, p. 311 – 317, 2006.
- SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, 2002. 717 p.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLER, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.
- SRINIVAS, G.; BABYKUTTY, S.; SATHIADEVAN, P.P.; SRINIVAS, P. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med. Res. Rev.* V. 27, p. 591-608, 2006.
- SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. *Bioch. Biophys. Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*, V. 1543, p. 223 – 238, 2000.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, T.; PATKAR, S.; JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Struc.* V. 2, p. 293 – 308, 1994.
- VOET, J.G.; VOET, D. **Biochemistry**. New York: John Wiley, 2004. 1591 p.

WARDMAN, P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin. Oncol.* V. 19, p. 397-417, 2007.