**Instituto de Química de São Carlos
Universidade de São Paulo**

Carolina Aparecida Sabatini

**Investigação da hidrólise enzimática de derivados da quinizarina por
espectroscopia e microscopia de fluorescência**

São Carlos

2012

Carolina Aparecida Sabatini

**Investigação da hidrólise enzimática de derivados da quinizarina por
espectroscopia e microscopia de fluorescência**

**Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo como parte dos requisitos
para a obtenção do título de doutor em
ciências.**

Área de concentração: Físico-Química

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique
Gehlen**

Exemplar revisado

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

São Carlos

2012

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Ao Professor Dr Marcelo Henrique Gehlen, pela oportunidade, orientação e paciência durante todos esses anos.

À Capes, pela bolsa concedida e à FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao IQSC, pelo infra-estrutura e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Johan Hofkens e ao Dr Kris P. F. Janssen da Universidade Católica de Leuven, pela assistência na elaboração do equipamento de microscopia confocal.

Ao Grupo de Fotoquímica, pelo auxílio infra-estrutural do trabalho.

Aos funcionários do CAQI, em especial ao Márcio, Sylvana, Tiago, pela infinita paciência e disponibilidade.

Aos amigos do Grupo de Fluorescência Molecular, Manu, Rafael, Milena, Tiago, Anderson, Aline, pela valiosa ajuda e apoio, sem esquecer os momentos de descontração durante todos estes anos.

A todos os amigos, Suzana, Manu, Candida, Willian, Guto, Ana, Puff, Isaac, Fábio, Ivan, que direta ou indiretamente sempre me ajudaram.

Ao técnico João Pedro, pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN.

Ao Prof. André Luiz Meleiro Porto, pelos diversos ensinamentos. E, juntamente com o Prof. Fergus Gesner, pela rica contribuição no exame de Qualificação.

Ao Prof. Sérgio Spinolla, por permitir as medidas de microscopia de força atômica (AFM) e aos alunos Diovani e Tiago pela imensa atenção e dedicação em fazê-las.

Ao Prof. Éder Cavalheiro e a Ana, pelas medidas de análise térmica e pelas ricas discussões.

À minha família e meu esposo Fábio, pelo apoio incondicional e por nunca me deixarem desistir.

*“Portanto não se preocupe com o dia de amanhã,
pois o dia de amanhã terá suas preocupações.
Basta a cada dia a própria dificuldade.” (Mateus 6, 34)*

Resumo

A cinética enzimática dos derivados de quinizarina com cadeias homólogas por lipases imobilizadas foi investigada por espectroscopia de fluorescência. Este estudo foi realizado em nível macroscópico e microscópico. Para o estudo macroscópico, foi utilizada a lipase suportada CALB (Novozyme® 435) e para o estudo microscópico a lipase *Rhizopus niveus* imobilizada em nanopartículas de sílica. Os derivados de quinizarina são espécies que não apresentam fluorescência, porém, quando são hidrolisados, tornam-se fluorescentes (quinizarina). Com um modelo cinético considerando um mecanismo de dois processos sequenciais do tipo Michaelis-Menten, foi possível fazer uma descrição adequada da evolução temporal da formação da quinizarina. O tempo médio de reação da hidrólise enzimática, em nível macroscópico, foi determinado para os derivados diacetato, dibutirato, dihexanoato e dioctanoato de quinizarina nos solventes hexano, ciclo-hexano e decalina saturados com água. No estudo microscópico, a lipase de *Rhizopus niveus* foi incorporada em nanopartículas de sílica de 200nm. A hidrólise enzimática foi monitorada por imagens e pela flutuação da intensidade de fluorescência com o tempo, por meio da microscopia de fluorescência confocal. Os resultados mostraram que, após a adição do substrato (derivados da quinizarina), começam a aparecer regiões fluorescentes devido ao trabalho enzimático (formação da quinizarina). As imagens de microscopia de fluorescência confocal não mostraram uma nítida diferença entre os substratos avaliados. Entretanto, o estudo da flutuação da intensidade de fluorescência mostrou que há uma diferença entre os substratos e que é possível estimar constantes de tempo de relaxação da atividade enzimática. Além disso, a atividade da lipase depende da forma em que a mesma está distribuída nas nanopartículas (ligada ou adsorvida) e também do tamanho da cadeia de alquílica que compões os derivados. O decaimento de fluorescência da quinizarina produzida pela hidrólise dos derivados pela lipase foi adquirido por microscopia de fluorescência confocal usando excitação de 2-fótons.

Abstract

The kinetics of enzymatic hydrolysis of quinizarin diester by supported lipase dispersed beads in organic solvents was investigated by fluorescence spectroscopy. This study was performed on macroscopic and microscopic levels. For the macroscopic study was used CALB immobilized lipase (Novozyme[®] 435) on acrylate beads, and for microscopic study *Rhizopus niveus* lipase immobilized on silica nanoparticles. The quinizarin derivatives (substrates) are non-fluorescent species, and only the end product quinizarin has fluorescence. A kinetic model considering two sequential Michaelis-Menten mechanisms provides a suitable description of the time evolution of the quinizarin formation monitored by emission spectroscopy and photon counting measurements. The average reaction time of the enzymatic hydrolysis was determined for quinizarin diacetate, dibutirate, dihexanoate and dioctanoate in hexane, cyclohexane and decaline water saturated solvents. In the microscopic study, the *Rhizopus niveus* lipase was dispersed into and bound silica mesoporous 200nm particles. In both systems, dispersed silica nanoparticles and a small fraction of aggregates are found in thin film. The enzyme activity was monitored by images and fluctuations of fluorescence intensity over time using confocal fluorescence microscopy. The results showed that after addition of substrate fluorescent spots due to enzyme activity start to appear. Confocal fluorescence images showed no clear difference among substrates. However, the study of fluorescence intensity fluctuations showed that enzyme activity depends on the type of substrate and enzyme support. In addition, the lipase activity depends on the form in which it is distributed in the nanoparticles (bound or entrapped) and the size of the alkyl diester derivatives. The fluorescence decay of quinizarin produced by lipase hydrolysis of diester was measured by confocal fluorescence microscopy using 2-photon pulse excitation.

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura química da quinizarina (Qz).	20
Figura 2 – Tautomeria ceto-enólica da quinizarina assistida por efeito RAHB [28, 29] (A) 1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona; (B) 4,9-di-hidroxi-1,10-antraquinona; (C) 9,10-di-hidroxi-1,4-antraquinona.	21
Figura 3 – Esquema da reação de esterificação.	23
Figura 4 – Diagrama de Jablonski.	24
Figura 5 – Diagrama de Jablonski com excitação com 1-fóton (A) e com 2-fótons (B). O estado fundamental, o primeiro e o segundo estados eletrônicos excitados estão representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente e, o primeiro estado triplete é dado por T_1 . IC: processo de conversão interna; ISC: processo de cruzamento intersistemas. Adaptado de [37].	26
Figura 6 – Esquema do arranjo óptico de alguns microscópios. (A) Sistema do microscópio convencional; (B) Sistema do microscópio de varredura convencional; (C) Sistema do microscópio confocal. Adaptado de Wilson, 2002 [40].	28
Figura 7 – Esquema de um microscópio confocal moderno. Adaptado de WÖLL, D. et al, 2009 [43].	30
Figura 8 – Esquema da reação de preparação do derivado da quinizarina (DAQ).	33
Figura 9 – Reação de esterificação da quinizarina (Qz) em diclorometano.	33
Figura 10 – Esquema do mecanismo de reação da catálise básica [52].	36
Figura 11 – Esquema de preparação das nanopartículas de sílica com a lipase ligada (Si-Prop-RN)...	37
Figura 12 – Esquema da instrumentação construída no laboratório de Fluorescência Molecular: $\lambda/4$ = placa de $\frac{1}{4}$ de onda de ordem zero; XYZ = Nanoposicionador; APD = Fotodiodo Avalanche; IX71 = Microscópio invertido; PC = microcomputador.	41
Figura 13 – (A) Fotografia dos equipamentos construídos no Grupo de Fluorescência Molecular. (B) Detalhes da linha de detecção.	42
Figura 14 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz da quinizarina em CDCl_3	44
Figura 15 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DAQ em CDCl_3	45
Figura 16 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DBQ em CDCl_3	46
Figura 17 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DHQ em CDCl_3	47
Figura 18 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DOQ em CDCl_3	48
Figura 19 – Espectro de infravermelho da quinizarina em pastilha de KBr.	49
Figura 20 – Espectro de infravermelho da quinizarina e de seus derivados em pastilha de KBr.	49
Figura 21 – Espectro de absorção da quinizarina (Qz) (—) e seus derivados (DAQ, DBQ, DHQ, DOQ) (---) em (A) ciclo-hexano, (B) hexano e (C) decalina, concentração aproximada dos compostos: $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para todos os solventes utilizados, temperatura ambiente.	51
Figura 22 – Estruturas tautoméricas da quinizarina.	52
Figura 23 – Espectro de emissão da quinizarina ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{nm}$) e seus derivados ($\lambda_{\text{ex}} = 330\text{nm}$) em (A) ciclo-hexano, (B) hexano e (C) decalina, $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	53
Figura 24 – Estrutura da quinizarina ilustrando a formação dos dois anéis <i>quasi</i> -aromáticos com interação do tipo RAHB.	54
Figura 25 – Esquema do mecanismo enzimático da lipase CALB. Ser: serina; Asp: ácido aspártico; His: histidina [55].	57
Figura 26 – Estruturas moleculares dos substratos diéster (QzR_2), monoéster (QzR) e a quinizarina (Qz) em um processo enzimático de duas etapas.	58

Figura 27 – Monitoramento da reação de hidrólise em função do tempo do derivado DHQ em hexano. [DHQ] = $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $m_{\text{CALB}} = 20\text{mg}$, $T = 298\text{K}$.	59
Figura 28 – Espectros de emissão de fluorescência obtidos do monitoramento da reação de hidrólise em função do tempo do derivado DHQ em hexano. [DHQ] = $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 484\text{nm}$, $m_{\text{CALB}} = 20\text{mg}$, $T = 298\text{K}$, agitação constante.	60
Figura 29 – Monitoramento da reação do derivado DHQ no meio solvente. ($V_{\text{H}_2\text{O}} = 50\mu\text{L}$, $\lambda_{\text{ex}} = 484\text{nm}$).	61
Figura 30 – Acompanhamento da reação de hidrólise do DHQ em hexano. (Ilustração do comportamento sigmoidal).	62
Figura 31 – Modelo cinético proposto para as reações sequenciais. Para a identificação das espécies vide figura 26.	62
Figura 32 – Simulação da cinética enzimática da formação do produto Qz assumindo que: $QzR20 = 1,0$; $E^0 = 0,5$; $k_1 = 0,4$; $k_{-1} = 3,0$; $k_c = 0,1$; $K_M = 7,7$. A linha pontilhada representa a solução do estado estacionário dada pela equação 6 com parâmetro $k = 0,00645$. (o) é a solução numérica do sistema de equação de velocidade usando o método de integração de Runge-Kutta em quarta ordem. A linha contínua consiste no ajuste não linear dos pontos numéricos usando a equação 6 que fornece o parâmetro $k' = 0,00582$.	64
Figura 33 – Simulação da cinética enzimática da formação do produto Qz assumindo que: $QzR20 = 1,0$; $E^0 = 0,5$; $k_1 = 0,7$; $k_{-1} = 3,0$; $k_c = 0,1$; $K_M = 4,4$. A linha pontilhada representa a solução do estado estacionário dada pela equação 6 com parâmetro $k = 0,0113$. (o) é a solução numérica do sistema de equação de velocidade usando o método de integração de Runge-Kutta em quarta ordem. A linha contínua consiste no ajuste não linear dos pontos numéricos usando a equação 6 que fornece o parâmetro $k' = 0,0086$.	65
Figura 34 – Intensidades integradas normalizadas para o derivado DAQ $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 484\text{nm}$, $T = 298\text{K}$) em ciclo-hexano, hexano e decalina. O ajuste das curvas foi feito utilizando a equação 6.	67
Figura 35 – Curvas das constantes obtidas da reação de hidrólise dos derivados da quinizarina em função da quantidade de enzima CALB adicionada nos solventes utilizados. (A) – DAQ; (B) – DBQ; (C) – DHQ.	69
Figura 36 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 preparadas pelo método de Stöber, $d = 200 \pm 13\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.	71
Figura 37 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 com a lipase adsorvida (Si-RN) preparadas pelo método de Stöber, $d = 180 \pm 14\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.	71
Figure 38 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 com a lipase ligada (Si-Prop-RN) preparadas pelo método de Stöber, $d = 196 \pm 13\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.	72
Figura 39 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal antes da adição do substrato, (contagem média: 60cps; equivalente a contagem de fundo).	74
Figura 40 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal do sistema Si-RN (lipase adsorvida na SiO_2), $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano. (cps: contagem média por segundo da região de emissão).	76

Figura 41 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal do sistema Si-Prop-RN (lipase ligada na SiO ₂), $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano. (cps: contagem média por segundo da região de emissão).....	77
Figura 42 – Imagens de MEV do filme fino das nanopartículas de sílica (Si-RN) dispersas em PVP.	78
Figura 43 – Imagem de AFM do filme fino das nanopartículas de sílica (Si-RN) dispersas em PVP.....	79
Figura 44 – Etapas sequenciais do modelo cinético duplo do tipo de Michaelis-Menten (substratos: diéster (QzR ₂), monoéster (QzR) e quinizarina (Qz)).	81
Figura 45 – Esquema da hidrólise enzimática da lipase <i>Rhizopus niveus</i> . Ser: serina; Asp: ácido aspártico; His: histidina [61, 62].	82
Figura 46 – Representação do gráfico de flutuação de contagem <i>versus</i> tempo obtido sem tratamento prévio. (Gráfico de contagem do Si-RN com o substrato C2 em ciclo-hexano. Tempo de integração = 20ms).	83
Figura 47 – Gráfico de contagem de fótons <i>versus</i> tempo das nanopartículas de SiO ₂ com lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DAQ (<i>threshold</i> está indicado pela linha horizontal pontilhada). Abaixo, conversão binária ON(1) – OFF(0) do gráfico de contagem. Tempo de integração = 20ms.....	84
Figura 48 – Gráfico de contagem de fótons <i>versus</i> tempo das nanopartículas de SiO ₂ com lipase ligada (Si-Prop-RN) após a adição do substrato DAQ (<i>threshold</i> está indicado pela linha horizontal pontilhada). Abaixo, conversão binária ON(1) – OFF(0) do gráfico de contagem. Tempo de integração = 20ms)	85
Figura 49 – Esquema do trabalho enzimático durante a medida de microscopia de fluorescência confocal. Neste esquema S: substrato, E: lipase, Qz: quinizarina, Qz*: quinizarina no estado excitado, : nanopartículas de sílica com a lipase incorporada.....	86
Figura 50 – Frequência de tempo de relaxação OFF normalizada dos agregados do sistema Si-RN para os diferentes substratos adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano.	87
Figura 51 – Frequência de tempo de relaxação de OFF normalizada dos agregados do sistema Si-Prop-RN para os diferentes substratos adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano.	88
Figura 52 – Imagem de microscopia de fluorescência de um pequeno agregado de nanopartículas de sílica com a lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DAQ ($\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$) e seu correspondente gráfico de contagem.	90
Figura 53 – Imagem de microscopia de fluorescência de um pequeno agregado de nanopartículas de sílica com a lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DOQ ($\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$) e seu correspondente gráfico de contagem.	90
Figura 54 – Frequência de tempo de relaxação de OFF normalizada dos agregados do sistema Si-RN para os diferentes substrato adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. A concentração dos substratos foi da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano.	91
Figura 55 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal de um pequeno agregado de nanopartículas do sistema Si-RN após a adição do substrato DAQ (excitação com 2-fótons) e decaimento de fluorescência da quinizarina formada na reação de hidrólise. Excitação com 2-fótons, $\chi^2 = 1,025$	92

Figura 56 – Decaimento de fluorescência da quinizarina em filme polimérico de PVP. Excitação com 2-fótons, $\chi^2 = 1,140$	93
Figura 57 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal do fungo <i>Xylaria sp.</i>	95

Lista de tabelas

Tabela 1 – Métodos de imobilização de enzimas. Adaptado de [1].....	18
Tabela 2 – Intervalos médios do ponto de fusão dos derivados da quinizarina.	43
Tabela 3 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência da quinizarina e seus derivados.	55
Tabela 4 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação (2/k) dos derivados da quinizarina nos solventes hexano.	67
Tabela 5 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação (2/k) dos derivados da quinizarina nos solventes ciclo-hexano.....	68
Tabela 6 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação (2/k) dos derivados da quinizarina nos solventes decalina.	68
Tabela 7 – Valores médios da porcentagem de nitrogênio presente nos sistemas estudados.	73
Tabela 8 – Tempo da relaxação de tempo OFF normalizado dos agregados de nanopartículas de SiO ₂ com a lipase adsorvida (Si-RN) e com lipase ligada (Si-Prop-RN).	89

Lista de siglas e símbolos

aa: aminoácido

Abs: absorbância

DAQ, DBQ, DHQ, DOQ: derivados da quinizarina

DAQ: diacetato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-diila

DBQ: dibutanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-diila

DHQ: dihexanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-diila

DOQ: dioctanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-diila

dd: duplo dubleto

E: enzima

FCS: espectroscopia de correlação de fluorescência

FTIR: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

ϕ : rendimento quântico de emissão de fluorescência

$K_{1,2}$: constante de associação

$K_{-1,-2}$: constante de dissociação

K_{C1}, K_{C2} : constantes catalíticas da primeira e da segunda etapa da reação de hidrólise

K_M : constante de Michaelis-Menten

qt: quinteto

Qz: quinizarina

RAHB: ligação de hidrogênio assistida por ressonância

RMN: ressonância magnética nuclear

s: singleto

S: substrato

Si-RN: lipase *Rhizopus niveus* adsorvida em nanopartículas de sílica

Si-Prop-RN: : lipase *Rhizopus niveus* ligada em nanopartículas de sílica

t: tripleto

τ : tempo de vida de emissão de fluorescência

Sumário

1- INTRODUÇÃO	15
1.1 – Enzimas	15
1.2 – Biocatalisadores imobilizados.....	16
1.3 – Quinizarina	21
1.4 – Reação de esterificação da quinizarina	22
1.5 – Fotofísica	23
1.5.1 – Absorção e emissão de fluorescência.....	23
1.5.2 – Excitação com 1-fóton	25
1.5.3 – Excitação com 2-fótons.....	26
1.6 – Microscopia de fluorescência confocal.....	27
1.6.1 – Princípio da microscopia de fluorescência confocal.....	29
2 – OBJETIVO.....	31
3 – PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 – Preparação dos derivados da quinizarina	32
3.1.1 – Diacetato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1,4-diila (DAQ).....	32
3.1.2- Dibutanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1,4-ila (DBQ), Dihexanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1,4-ila (DHQ), Dioctanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1,4-ila (DOQ)	33
3.2 – Determinação do ponto de fusão	34
3.3 – Caracterização estrutural.....	34
3.4 – Hidrólise enzimática.....	34
3.5 – Caracterização fotofísica.....	35
3.5.1 – Absorção e fluorescência estacionárias.....	35
3.5.2 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência.....	35
3.6 – Preparação dos sistemas com a lipase imobilizada	35
3.6.1 – Nanopartículas de sílica – SiO₂	35
3.6.2 – Nanopartículas de sílica com lipase adsorvida – Si-RN	36
3.6.3 – Nanopartículas de sílica com lipase ligada – Si-Prop-RN	36
3.7 – Caracterização morfológica	38
3.7.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
3.7.2 – Microscopia de varredura de força atômica (AFM).....	38
3.8 – Microscopia de fluorescência confocal.....	38
3.8.1 – Preparação das amostras.....	38

3.8.2 – Imagens e gráficos de contagem	40
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1 – Caracterização estrutural.....	44
4.2 – Caracterização fotofísica.....	50
4.2.1 – Espectros de absorção e emissão de fluorescência estacionária	50
4.2.2 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência.....	54
4.3 – Cinética enzimática	55
4.3.1 – Determinação da quantidade de enzima presente na lipase CALB (Novozyme® 435).....	55
4.3.2 – Estudo macroscópico da hidrólise enzimática.....	56
4.4 – Estudo da ação enzimática por microscopia de fluorescência confocal	70
4.4.1 – Caracterização morfológica	70
4.4.1.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	70
4.5 – Determinação da quantidade de enzima presente nos sistemas Si-RN e Si-Prop-RN.....	72
4.6 – Microscopia de fluorescência confocal.....	74
4.6.1 – Hidrólise enzimática.....	80
4.6.2 – Avaliação da ação enzimática por microscopia de fluorescência confocal	81
4.6.3 – Tempo de vida obtido por microscopia de fluorescência confocal	91
5 – CONCLUSÕES	94
6 – Perspectivas de trabalhos futuros	95
6.1 – Microscopia de fluorescência do fungo <i>Xylaria</i> sp	95
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Enzimas

Enzimas são proteínas constituídas de cadeias peptídicas, apresentando uma estrutura tridimensional característica, o que lhes permite promover reações específicas. Uma enzima pode receber diversas moléculas similares em seu sítio catalítico devido à alta flexibilidade de sua estrutura protéica [1]. São altamente regio, quimio e estereosseletivas (especificidade de reação) e específicas (especificidade de substrato), podendo atuar em diversas reações químicas [2]. As reações promovidas por enzimas ocorrem a temperaturas próximas à temperatura ambiente e podem ocorrer em meio aquoso ou em meio orgânico, dependendo do tipo de reação. A classificação das enzimas depende do tipo de reação que catalisam e é dada de acordo com o órgão internacional *Enzyme Commission - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*. A nomenclatura é formada por letras e números que estão correlacionados com o substrato (substância modificada pela enzima).

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise (ou formação) de ésteres, formando os respectivos alcoóis e ácidos carboxílicos. Por sua função digestiva, a lipase é capaz de acomodar substratos com uma ampla diversidade estrutural, com cadeias alifáticas, cíclicas, bicíclicas, além de ésteres aromáticos [3]. A atividade catalítica das lipases é pouco alterada em solventes puramente aquosos ou orgânicos, porém ela apresenta uma atividade catalítica maior quando se encontra em uma interface água-solvente orgânico. Este fenômeno é chamado ativação interfacial e ocorre porque ao trabalhar na interface, a enzima tem o acesso favorecido ao substrato (lipídeos, que geralmente permanecem na fase orgânica apolar) e os produtos da reação (ácido graxo + glicerol) são liberados para o meio aquoso [4]. Embora as lipases pertençam a uma classe de enzimas conceitualmente hidrolíticas (hidrolases), em meio orgânico, elas conseguem catalisar uma variedade de reações. Desta forma, as lipases são excelentes biocatalisadores que podem atuar na catálise de reações químicas que envolvam substratos insolúveis em meio aquoso [5].

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais ou microbianas, sendo esta última mais utilizada por apresentarem

procedimentos de isolamento mais simples, por serem mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes. Estes biocatalisadores não requerem cofatores, atuam em larga faixa de pH e temperatura e apresentam a capacidade única de atuar na interface óleo/água [5]. São amplamente utilizadas como catalisadores em diversos processos industriais, como produção de detergente, alimentos, agentes flavorizantes, insumos químicos, biossensores e biorremediação, por exemplo [6]. O estudo de reações de hidrólise, ou formação de éster, catalisadas por lipases, também é de grande importância no campo da biossíntese orgânica [7-9]. Entre os diversos produtos que podem ser obtidos da biotransformação de óleos e gorduras estão os biocombustíveis (biodiesel), a síntese de monoglicerídeos, empregados como emulsificantes, e a reestruturação de triglicerídeos visando a produção de alimentos com propriedades organolépticas e nutricionais desejáveis [5].

O progresso da biocatálise tem sido notório nos últimos anos, principalmente nos seguintes campos: *screening* de enzimas e de micro-organismos, mutação de enzimas, uso de enzimas hipertermofílicas, uso de células vegetais como biocatalisadores, uso de solventes alternativos, imobilização de enzimas, entre outros. Além disso, as aplicações da biocatálise na produção de bens de consumo de alto valor agregado é uma realidade. Porém, ainda faltam muitos estudos e empenho para aprimorar e racionalizar esses processos para que deixem de ser usados de forma empírica. Isso só será possível com a integração dos diversos profissionais, ou seja, com trabalhos multidisciplinares envolvendo químicos, bioquímicos, microbiologistas, entre outras especialidades [1].

Neste contexto, a imobilização de enzimas tem grande apelo industrial, uma vez que sua estabilidade é significativamente aumentada. O processo de imobilização de enzima gera o que denominamos de biocatalisadores imobilizados [10].

1.2 – Biocatalisadores imobilizados

A imobilização de enzimas consiste no confinamento ou localização das mesmas. O método de imobilização deve ser baseado em parâmetros como atividade global da enzima imobilizada, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de

imobilização, toxicidade dos reagentes e propriedades finais desejadas. Há uma série de vantagens na imobilização de uma enzima: utilização da atividade catalítica por maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, em alguns casos; facilidade de interrupção da reação pela remoção da enzima; ajuste do tempo de residência em um reator contínuo. Entretanto, é necessária a escolha de um procedimento para cada tipo de enzima a ser imobilizada, levando em consideração sua aplicação [1].

Um biocatalisador imobilizado pode ser formado por uma única enzima, ou por um conjunto de enzimas, ou ainda por enzimas contidas no interior de uma célula retida(s) no interior ou na superfície de um material utilizado como suporte. O biocatalisador enzima-suporte deve manter as características físicas do suporte, bem como a atividade biológica da enzima.

A escolha do método de imobilização depende das propriedades físicas e químicas de cada superfície e das moléculas a serem imobilizadas. A interação entre a molécula e a superfície pode ser física (adsorção, forças eletrostáticas) ou química (ligação covalente) e a natureza da ligação determina a força da imobilização na maioria dos casos [11].

Na tabela, a seguir, está representado um resumo das vantagens e desvantagens de cada método de imobilização.

Tabela 1 – Métodos de imobilização de enzimas. Adaptado de [1].

Métodos	Vantagens	Desvantagens
<p>Adsorção</p>	Baixo custo; simples; não ocorre modificação química da enzima; possível regeneração do suporte.	Imobilização superficial; dessorção da enzima.
<p>Ligação covalente</p>	Não é afetado pelo pH, força iônica do meio ou concentração do substrato.	Não é possível regenerar o suporte; custo elevado.
<p>Encapsulação</p>	Não ocorre modificação química da enzima.	Limitação de difusão; não é efetiva para substratos de alta massa molar; susceptível à inativação da enzima; perda contínua de atividade devido ao tamanho dos poros.
<p>Ligação cruzada</p>	Enzimas fortemente ligadas	Perda de atividade enzimática durante a preparação; baixa estabilidade mecânica e alto custo.

Quando a imobilização envolve uma reação química, as condições devem ser suaves para evitar a inativação da enzima. Entretanto, se a ligação for feita com êxito, é possível obter uma enzima imobilizada com alta estabilidade. Imobilizações por ligação cruzada e por ligação covalente dificilmente são empregadas em grande escala, pois possuem baixa resistência mecânica e raramente podem ser regeneradas, respectivamente.

Um dos fatores críticos na imobilização das enzimas é a escolha do suporte. Estes podem ser classificados quanto sua morfologia e composição química. Quanto à morfologia podem ser: *porosos* (possui grande área superficial interna disponível; a enzima fica protegida das condições de turbulência externa); *não-porosos* (tem como principal vantagem a eliminação da resistência de difusão interna e como desvantagem a baixa área superficial); *estrutura em gel* (possui sérias limitações difusionais, funcionando melhor para substratos de baixo peso molecular). Com relação à composição química, podem ser *orgânicos* ou *inorgânicos*. Idealmente, um suporte deve ser inerte, ter grande área superficial, resistência mecânica elevada e baixo custo de produção. Porém, não existe um suporte ideal e universal para a imobilização de enzimas. É necessário avaliar todos os aspectos dos sistemas enzimáticos para decidir qual é o melhor arranjo entre a enzima e o suporte [12].

Um método bastante utilizado para a imobilização da enzima é o do processo sol-gel [5, 12]. Este utiliza precursores silicatos com o intuito de ligar, encapsular ou adsorver enzimas. Em geral, para se obter êxito neste processo é necessário fazer um controle rigoroso de fatores como temperatura, solvente, razão molar dos reagentes e tipo de precursor. O processo sol-gel é simples e envolve uma polimerização inorgânica em três etapas [5]:

- (I) A hidrólise de um precursor alcóxido, que leva à formação de um produto hidroxilado e o álcool correspondente.

- (II) Condensação entre um grupamento não hidrolisado do alcóxido e uma hidroxila (A) ou entre duas hidroxilas (B) com formação de uma mistura coloidal chamada de 'sol'.

- (III) Ocorre a policondensação entre os coloides, seguido da reticulação, o que forma uma rede tridimensional porosa.

O método de Stöber, processo sol-gel, é amplamente utilizado para a formação de nanopartículas de sílica [13]. Este consta da hidrólise/policondensação de um ortosilicato, utilizando hidróxido de amônio como catalisador e etanol como solvente para a obtenção de esferas de sílica com morfologia e tamanho controlados. Os precursores mais utilizados são os alcóxidos, entre os quais o mais estudado é o tetraetilortosilicato (TEOS).

Para o estudo da ação enzimática destes biocatalisadores, têm sido usadas várias ferramentas e métodos analíticos descritos na literatura. Dentre eles, o uso de compostos fluorocrômicos [14-20] tem estabelecido novos métodos e aberto importantes fronteiras em microscopia de fluorescência [21-23]. Porém, é necessário escolher o fluoróforo adequado para esta investigação. Um exemplo bastante aplicado é o das coumarinas, que são sondas fluorescentes utilizadas na detecção de sistemas por meio de reações hidrolíticas [20]. Em geral, são empregadas na detecção de anticorpos [24], no de *screening* de micro-organismos [25], na determinação da enantiosseletividade de hidrolases [26] e também de enzimas em micro-organismos isolados [27]. Apesar de serem amplamente utilizadas, as coumarinas apresentam uma restrição significativa, pois seu comprimento de onda de excitação está restrito a região do ultravioleta. Além disso, a maioria dos sistemas apresenta auto-fluorescência nesta região, o que pode impossibilitar ou mascarar a detecção do sinal proveniente da sonda fluorescente.

Outros fluoróforos como a quinizarina (1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona) não apresenta tais limitações, desde que seja derivatizada, já que seu comprimento de onda de excitação localiza-se na região do visível, na qual o processo de auto-fluorescência quase não existe. A estrutura química da quinizarina (Qz) é apresentada na figura 1.

Figura 1 – Estrutura química da quinizarina (Qz).

1.3 – Quinizarina

As antraquinonas são uma classe de substâncias aromáticas importantes na química de corantes e apresentam propriedades capazes de modular sua absorção e emissão de acordo com a posição e o tipo de substituinte. A 1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona (quinizarina) pertence a esta classe de compostos e apresenta emissão de fluorescência, devido possuir ligações de hidrogênio intramoleculares assistidas por ressonância (RAHB) que estabilizam os orbitais π e colocam a transição $\pi-\pi^*$ em mais baixa energia que a $n-\pi^*$, impedindo o cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ e desativação da fluorescência. Consequentemente, a energia absorvida é perdida pela emissão de radiação (fluorescência).

Em solução, a quinizarina existe como uma mistura de formas tautoméricas em equilíbrio. A tautomeria ceto-enólica, causada pela transferência interna de um próton, permite a formação de três estruturas canônicas mostradas na figura 2. Esta interação ceto-enólica implica na formação de um ciclo de seis elementos, o que contribui para o aumento da rigidez, planaridade e delocalização eletrônica, resultando em interessantes mudanças nas propriedades fotofísicas, por exemplo [28].

Figura 2 – Tautomeria ceto-enólica da quinizarina assistida por efeito RAHB [28, 29] (A) 1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona; (B) 4,9-di-hidroxi-1,10-antraquinona; (C) 9,10-di-hidroxi-1,4-antraquinona.

Cada tautômero é caracterizado pela sua própria banda de absorção $\pi\pi^*$, fazendo com que a quinizarina seja caracterizado como um composto que apresenta um complexo espectro de absorção. A banda larga na região do visível tem estruturas finas que dependem da natureza do solvente e da temperatura. Esta banda é mais estruturada em fase gasosa e em matrizes vítreas a 77K. Entretanto, quando a quinizarina é derivatizada, a estrutura fina da banda de absorção $\pi\pi^*$ desaparece completamente, pois ocorre a quebra da ligação de hidrogênio intramolecular [30].

Ligações de hidrogênio (quer seja inter ou intramolecular) podem ter um efeito significativo na reatividade, solubilidade e nas propriedades eletrônicas de um composto. Em sistemas aromáticos conjugados, a ligação de hidrogênio frequentemente resulta na alteração das bandas de absorção e emissão. Quando a ligação de hidrogênio é interrompida pela introdução de algum grupo, a forma derivatizada do composto pode ser usada como um precursor, tendo propriedades latentes ao composto inicial e que retornam após a remoção deste grupo [31].

1.4 – Reação de esterificação da quinizarina

A acilação de alcoóis aromáticos e fenóis é de grande importância em síntese orgânica para preparação de ésteres aromáticos e também para proteção dos grupos hidroxilas. Esta reação pode ser feita em meio básico sob refluxo, utilizando diclorometano como solvente [32]. Compostos aromáticos como hidroxiantraquinonas são bastante estudados em sínteses fotoiniciadas e na fotobiologia [33]. Em particular, a quinizarina (Qz) pode ser bastante interessante por apresentar uma fotofísica peculiar quando esterificada. A esterificação da quinizarina provoca um deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção e, além disso, as propriedades de emissão de fluorescência também são alteradas, de forma que seu derivado não apresenta emissão. [31]. A reação de esterificação pode ser realizada com haletos de ácido, não sendo necessária a utilização de catalisador, devido sua alta reatividade com nucleófilos fracos. No entanto, é necessária a presença de uma base (uma amina terciária ou amina heterocíclica) para neutralizar os prótons gerados na reação e prevenir a diminuição do pH no meio reacional [34, 35].

A formação do éster, esquematizada na figura 3, é relativamente rápida e com pouca reação lateral. Porém, se as condições não forem mantidas anidras, pode-se reduzir o rendimento devido à hidrólise rápida do cloreto de ácido para ácido carboxílico [36].

Figura 3 – Esquema da reação de esterificação.

1.5 – Fotofísica

1.5.1 – Absorção e emissão de fluorescência

O diagrama de Jablonski, figura 4, é muito útil para visualizar os processos fotofísicos. As linhas horizontais em negrito representam os estados eletrônicos e as linhas horizontais estreitas os estados vibracionais correspondentes aos respectivos estados eletrônicos.

Figura 4 – Diagrama de Jablonski.

O processo de absorção é mais rápido do que os demais, ocorre em torno de 10^{-15} s. A absorção ideal ocorre de acordo com a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \ell [C] \quad \text{equação 1}$$

na qual **A** é a absorbância, **ϵ** é o coeficiente de absortividade molar para um dado comprimento de onda λ da radiação, ℓ é o caminho óptico e **[C]** é a concentração da espécie absorvente.

Existem diferentes formas de decaimento ou desativação dos estados excitados, como esquematizado no diagrama de Jablonski. A fluorescência e a fosforescência são transições radiativas que envolvem a liberação de fótons. Porém, podem ocorrer outras formas de transição não-radiativas. Os processos não-radiativos são a relaxação vibracional, a conversão interna e o cruzamento intersistemas.

O processo de fluorescência é governado por três eventos importantes que ocorrem em escalas de tempo bastante diferentes. A excitação ocorre quando um fóton é absorvido por um fluoróforo (processo de absorção) levando um elétron para um estado de maior

energia. A relaxação vibracional do estado excitado (conversão interna) para um nível de menor energia é um processo mais lento e ocorre em picossegundos (10^{-12} s). A última etapa, a emissão do fóton (processo de fluorescência) e o retorno da molécula para o estado fundamental, ocorre num período de tempo relativamente mais longo, tipicamente em nanossegundos (10^{-9} s).

A fluorescência tem sido bastante utilizada para gerar e aumentar o contraste em amostras biológicas que, devido à sua baixa variação de índice de refração, apresentam contraste muito pequeno. Neste contexto, a microscopia de fluorescência confocal tem um papel muito importante, uma vez que, através da mesma, é possível gerar imagens de alta resolução.

1.5.2 – Excitação com 1-fóton

A excitação por 1-fóton ocorre quando um fóton é absorvido por um fluoróforo, levando um elétron para o estado eletrônico excitado, do qual ele relaxa para o estado eletrônico fundamental, emitindo um fóton com energia mais baixa. Para a absorção ocorrer, a energia de excitação tem que ser igual a diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental. A absorção de um fóton mais energético no ultravioleta pode excitar a molécula para o estado singlete S_2 , do qual ela sofre uma perda de energia não-radiativa por conversão interna para o estado singlete S_1 . Deste último estado podem existir várias possibilidades. A maioria dos fluoróforos retorna para o estado fundamental, emitindo um fóton. Este fóton emitido (fluorescência) possui energia menor (ou seja, maior comprimento de onda) do que o absorvido originalmente (deslocamento de Stokes). O tempo deste processo é da ordem de 10^{-9} s e é denominado como o tempo de vida de fluorescência e refere-se ao tempo médio de duração entre a absorção e a emissão de fluorescência de um fóton. Ele é tipicamente distribuído exponencialmente e é altamente sensível ao ambiente do fluoróforo. A partir do estado S_1 também pode ocorrer a emissão de um fóton por fosforescência. Neste caso, o elétron excitado sofre cruzamento intersistemas para o estado triplete T_1 , antes de voltar para o estado fundamental. O tempo de vida do estado excitado T_1 é da ordem de 10^{-4} s podendo chegar a minutos. O retorno

para o estado fundamental é acompanhada pela emissão de um fóton com rendimento quântico de fluorescência reduzido devido a transições $T_1 \rightarrow S_1$ ser proibida por spin [37].

1.5.3 – Excitação com 2-fótons

A emissão de fluorescência pela excitação de 2-fótons se refere à excitação do fluoróforo quando dois fótons excitam uma molécula em uma janela de tempo da ordem de attossegundo (10^{-18} s) até fentossegundos (10^{-15} s). Na combinação de 2-fótons, as energias se somam para dar a diferença de energia entre os estados singletes com transições $S_0 \rightarrow S_n$, para $n = 1, 2$. Por razões práticas, dois fótons de igual comprimento de onda são normalmente usados. Uma vez no estado excitado, os elétrons compartilham a mesma probabilidade como na excitação com 1-fóton. Este tipo de excitação requer um fluxo de fótons extremamente alto, geralmente 10^{20} - 10^{30} fótons / ($\text{cm}^2 \text{ s}$), normalmente obtido pela excitação com um laser de pulsos ultra-curto.

Figura 5 – Diagrama de Jablonski com excitação com 1-fóton (A) e com 2-fótons (B). O estado fundamental, o primeiro e o segundo estados eletrônicos excitados estão representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente e, o primeiro estado triplete é dado por T_1 . IC: processo de conversão interna; ISC: processo de cruzamento intersistemas. Adaptado de [37].

Devido à enorme sensibilidade de emissão, resolução espacial e temporal e a alta especificidade da fluorescência, esta técnica é uma importante ferramenta moderna na biologia celular.

1.6 – Microscopia de fluorescência confocal

O conceito básico de microscopia confocal foi desenvolvido originalmente por Marvin Minsky, em meados de 1950, quando fez seu pós-doutorado na universidade de Harvard. Ele queria obter imagens de redes neurais não coradas de tecido cerebral e foi impulsionado pelo desejo de obter eventos biológicos que ocorrem em sistemas vivos. A invenção de Minsky permaneceu despercebida por um tempo, até que, em 1960, David Egger e Mojmir Petran fabricaram um microscópio confocal de feixes múltiplos. Em 1973, D. Egger publicou as primeiras imagens que foram reconhecidas como células. E, com o avanço da informática e da tecnologia a laser, no final dos anos 80, foi possível conseguir imagens digitais, o que conduziu a um crescente interesse em microscopia confocal. Em 1979, o físico holandês Fred G. Brakenhoff desenvolveu um microscópio confocal de varredura, enquanto que, simultaneamente, Colin Sheppard contribuiu para a técnica de formação de imagem. Os primeiros instrumentos comerciais surgiram somente em 1987. Durante a década de 90, os avanços em óptica e eletrônica proporcionaram lasers mais estáveis e poderosos, espelhos de varredura de alta eficiência, fibra óptica de alto rendimento e detectores com baixo nível de sinal de ruído. Além disso, novos fluoróforos foram sintetizados, de modo que fossem adequados as linhas de excitação de cada laser utilizado. Todos estes fatos impulsionaram a microscopia confocal moderna que hoje consiste em um sistema eletrônico integrado completo, no qual o microscópio desempenha um papel central na configuração que possui um ou mais detectores eletrônicos, um computador (para exibição, processamento, saída e armazenamento de imagem) e vários sistemas de laser combinados com dispositivos de seleção de comprimento de onda. Estes microscópios estão sendo utilizados para investigações de moléculas, células e tecidos vivos o que não era possível até pouco tempo atrás.

Um microscópio consiste em um instrumento que amplifica objetos por meio de lentes, revelando detalhes invisíveis a olho nu. Assim, um microscópio forma a imagem de um objeto. Existem diferentes tipos de microscópios: convencional, de varredura e confocal [38]. Dentre estes três, o microscópio que possui maior resolução é o confocal. Neste caso, entende-se resolução como a mínima separação entre dois pontos que promove um contraste entre eles. Na microscopia confocal, esta resolução é conseguida devido à fonte de luz ser uma fonte pontual (em geral, um laser), iluminando uma pequena região da amostra, além do detector também ser pontual e detectar somente uma pequena área iluminada. A resolução também depende do comprimento de onda de luz (incidente e detectada) e da abertura numérica (NA) do arranjo óptico [39]. Abaixo, figura 6, está representado um esquema dos tipos de microscópios, com relação à fonte de excitação e à detecção.

Figura 6 – Esquema do arranjo óptico de alguns microscópios. (A) Sistema do microscópio convencional; (B) Sistema do microscópio de varredura convencional; (C) Sistema do microscópio confocal. Adaptado de Wilson, 2002 [40].

Nos últimos anos, houve uma expansão da técnica de microscopia confocal devido, em parte, à facilidade relativa da obtenção de imagens, alta qualidade das mesmas e ao crescimento do número de aplicações em biologia celular. O estudo de nanomateriais biofuncionalizados [41], da dinâmica de uma única molécula e da cinética enzimática de uma única enzima [43-48] também são exemplos de aplicações. Neste sentido, a microscopia confocal foi um dos avanços mais importantes em microscopia óptica.

1.6.1 – Princípio da microscopia de fluorescência confocal

Na microscopia confocal, as lentes objetivas focalizam a luz de excitação para um ponto de difração limitada. A fluorescência gerada, residente no volume confocal, é coletada pela mesma lente. Antes de atingir o detector, a luz de fluorescência passa por filtros apropriados e um *pinhole*, rejeitando sinais (de fluorescência) de fundo e luz fora do foco, respectivamente. A fluorescência emitida pode ser medida por um detector pontual como um fotodiodo avalanche (APD), por exemplo, que é muito eficiente na detecção de fótons e tem uma boa razão de sinal-ruído (SNR). Um bom sinal-ruído também é resultado de um volume de excitação extremamente pequeno, minimizando o efeito de espalhamento. A quantidade significativa da emissão de fluorescência que ocorre nos planos abaixo e acima do plano focal não é confocal com o *pinhole* (*out-of-focus light rays*) e, portanto, não contribui para a formação da imagem [43, 49]

Com a técnica confocal, uma molécula pode ser estudada em um dado momento pela medida de intensidade de fluorescência em função do tempo e, com o uso de luz pulsada, pode ser medido o tempo de vida desta molécula. A microscopia de fluorescência confocal também pode ser usada para dinâmicas de alta resolução temporal por longos períodos de tempo, se a fotoestabilidade do sistema em estudo permitir. Outra aplicação está na espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS). Na FCS, o feixe de excitação é focado em uma solução e há uma espera por moléculas fluorescentes passarem pelo volume confocal de excitação. O princípio básico desta técnica está em detectar como moléculas fluorescentes difundem no volume confocal. Uma análise de correlação dos sinais de intensidade de fluorescência flutuante tem como resultado a determinação da constante

difusional do sistema pelo estudo das flutuações da população das moléculas [37]. Um esquema da microscopia confocal está representado na figura 7.

Figura 7 – Esquema de um microscópio confocal moderno. Adaptado de WÖLL, D. et al, 2009 [43].

2 – OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação enzimática por meio de espectroscopia e microscopia de fluorescência utilizando derivados de quinizarina. As etapas realizadas para este estudo foram:

- 1 – Preparação dos derivados acilados da quinizarina com cadeias homólogas;
- 2 – Estudo macroscópico da hidrólise enzimática da lipase CALB utilizando os derivados da quinizarina como substratos;
- 3 – Preparação de biocatalisadores imobilizados em nanosistemas;
- 4 – Avaliação da ação enzimática de biocatalisadores imobilizados por microscopia de fluorescência confocal;
- 5 – Determinação do tempo de vida dos produtos formados da hidrólise dos substratos pelos biocatalisadores imobilizados, por meio de microscopia de fluorescência confocal.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Preparação dos derivados da quinizarina

A estrutura química dos derivados acilados da quinizarina, preparados neste trabalho, está representada a seguir.

3.1.1 – Diacetato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1,4-diila (**DAQ**)

O derivado da quinizarina de cadeia menor (2 carbonos) preparado por meio da reação de esterificação com anidrido acético, como descrito em Massucatto, 2009 [50]. Para tal foram utilizados 100mg de quinizarina (98%, Fluka) em 1mL de anidrido acético (98,5%, Merck) com 1 gota de H₂SO₄ concentrado (catalisador). Esta mistura foi colocada no ultrassom por 5 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi vertida em 20g de gelo picado para promover a hidrólise do anidrido acético excedente e a precipitação do produto (DAQ). O sólido obtido foi filtrado em funil sinterizado de porosidade média, lavado com porções de água Milli-Q gelada e depois com etanol gelado. A secagem foi feita em dessecador a vácuo e o rendimento obtido após as etapas de purificação foi de 55%. Esta síntese com

ultrassom é mais rápida do que métodos descritos na literatura e com rendimento semelhante [50, 51]. O esquema de reação está representado na figura 8.

Figura 8 – Esquema da reação de preparação do derivado da quinizarina (DAQ).

3.1.2- Dibutanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-ila (**DBQ**), Dihexanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-ila (**DHQ**), Dioctanoato de 9,10-dioxo-9,10-di-hidroantracen-1,4-ila (**DOQ**)

A preparação dos derivados da quinizarina (DBQ, DHQ, DOQ) foi realizada pela reação de esterificação da mesma com um cloreto de ácido de cadeias homólogas (de 4 a 8 carbonos) na presença de uma base (triethylamina) em diclorometano (destilado previamente), sob refluxo (40°C). O cloreto de ácido com leve excesso estequiométrico foi adicionado lentamente sobre a solução da quinizarina sob agitação constante. O esquema de reação está representado na figura 9.

Figura 9 – Reação de esterificação da quinizarina (Qz) em diclorometano.

Após 4 horas de reação, sob refluxo e agitação constante, foram realizadas diversas lavagens da mistura reacional com água Milli-Q (extração líquido-líquido) com o propósito de desativar o cloreto de ácido e retirar seu excesso. O produto de interesse permaneceu na fase orgânica e, por rotaevaporação, obteve-se um sólido amarelo que foi recristalizado em etanol para a obtenção do derivado diesterificado da quinizarina. Todos os derivados da quinizarina apresentaram coloração amarela. A secagem dos mesmos foi feita em dessecador a vácuo. O rendimento após as etapas de purificação dos compostos foi de 72%, 68% e 79% para o DBQ, DHQ e DOQ, respectivamente. Todos os rendimentos das reações foram determinados após todas as etapas de purificação. Visualmente, todas as reações se mostraram quantitativas, pois se partia de uma solução vermelha de quinizarina e, no final, era obtida uma solução amarela clara do produto.

3.2 – Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado utilizando um capilar de vidro introduzido no equipamento XXXXX. Este utiliza um sistema elétrico de aquecimento que permite o aumento gradual e preciso e preciso da temperatura e um artefato óptico (jogo de lentes e/ou objetivas) que facilitam a visualização da temperatura de fusão de pequeníssimas quantidades do sólido.

3.3 – Caracterização estrutural

Os compostos preparados foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN, Bruker AC 200) e de infravermelho (FTIR, Bomen M-B).

3.4 – Hidrólise enzimática

A reação foi feita em cubeta de quartzo para fluorescência utilizando 2,5mL de solução do derivado de quinizarina nos solvente hexano, ciclo-hexano e decalina, saturados com água, lipase CALB (com variações de massa de 10-50mg) sob agitação constante. O monitoramento da reação foi realizado em um espectrofluorímetro da Edinburg Instruments, modelo CD 900, configurado de modo a adquirir espectros de emissão no intervalo de 500 a 700nm, com comprimento de onda de excitação de 480nm (máximo de

emissão da quinizarina) por contagem de fótons. O equipamento foi programado para medir espectros em intervalos de tempo programados.

3.5 – Caracterização fotofísica

3.5.1 – Absorção e fluorescência estacionárias

Os espectros de absorção (Varian, Cary 5G) e de emissão de fluorescência estacionária (Hitachi F4500) das soluções diluídas foram obtidos por meio do uso de cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm, utilizando ciclo-hexano, hexano e decalina como solventes.

3.5.2 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência

As medidas de rendimento quântico foram feitas utilizando os padrões sulfato de quinina (0,1M em H_2SO_4), $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{nm}$, $\phi = 0,57$, e rodamina B em etanol, $\lambda_{\text{ex}} = 510\text{nm}$, $\phi = 0,49$, para determinar o rendimento quântico dos derivados e da quinizarina, respectivamente. A densidade óptica foi mantida em torno de 0,05, para evitar efeitos de filtro interno. E, tanto o padrão quanto a amostra foram excitados no mesmo comprimento de onda, para que não fosse necessária correção da intensidade de excitação em diferentes comprimentos de onda [53].

3.6 – Preparação dos sistemas com a lipase imobilizada

3.6.1 – Nanopartículas de sílica – SiO_2

As nanopartículas de sílica foram preparadas pelo método de Stöber adaptado [13]. A preparação foi feita pela catálise básica, através da hidrólise e policondensação do tetraetilortosilicato (TEOS), utilizando hidróxido de amônio como catalisador e 2-propanol como solvente, figura 10. A razão molar utilizada para esta reação foi de 1:21:0,5 de TEOS:H₂O:NH₄OH.

Em um frasco de 20mL, foram adicionados 15mL de 2-propanol, 314μL de NH₄OH (Quimis) e 1000μL de TEOS (Fluka). A mistura foi homogeneizada e mantida sob agitação constante a 40°C por, aproximadamente, 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 1695μL

de água Milli-Q, sob agitação. Após 1h, o balão reacional foi colocado em banho de gelo para interromper a reação. A mistura reacional foi centrifugada a 10000rpm por 30min e o sólido lavado com 2-propanol (3 x 5mL) e seco em dessecador a vácuo. As nanopartículas SiO₂ foram armazenadas sob temperatura ambiente. O esquema da hidrólise e policondensação das nanopartículas de sílica está representado na figura 10.

Figura 10 – Esquema do mecanismo de reação da catálise básica [52].

3.6.2 – Nanopartículas de sílica com lipase adsorvida – **Si-RN**

As nanopartículas de SiO₂, com lipase adsorvida (Si-RN) também foram preparadas pelo método de Stöber. Porém, em vez da H₂O foi adicionada uma solução da lipase *Rhizopus niveus* (4,0U/mg; Fluka) 5mg mL⁻¹, para que as partículas fossem formadas na presença da lipase. Da mesma forma que no item anterior, após 1h, a reação foi interrompida com banho de gelo e a mistura centrifugada a 10000rpm por 30min. O sólido obtido foi lavado com 2-propanol (3 x 5mL) e com H₂O (6 x 5mL) para retirar a lipase não adsorvida internamente na rede porosa da sílica. As nanopartículas de Si-RN foram secas em dessecador a vácuo e mantidas sob refrigeração até análise.

3.6.3 – Nanopartículas de sílica com lipase ligada – **Si-Prop-RN**

Neste sistema a lipase foi ligada quimicamente à nanopartícula de sílica através de um haleto de alquila [56]. Tendo preparado as nanopartículas de sílica pelo método de Stöber [13], adicionou-se, em um balão de reação, 500μL de (3-cloropropil)triétoxissilano (Sigma-Aldrich) e 50mg da nanopartícula de sílica, preparada anteriormente, em 10mL de

solvente seco (acetona previamente destilada), sob agitação constante e refluxo por 24h. O sólido obtido foi lavado com acetona (3 x 5mL), tendo-se, assim, a sílica cloropropil (**Si-Prop-Cl**) que foi utilizada como suporte para a imobilização da lipase. Para tal, adicionou-se 50mg da lipase *Rhizopus niveus* (4,0U/mg; Fluka) no meio contendo Si-Prop-Cl em 10mL de acetona previamente destilada. Este permaneceu sob aquecimento brando (40°C) e agitação constante por 2h. A mistura reacional foi centrifugada (10000rpm por 30min), de modo a obter a sílica com a lipase ligada (**Si-Prop-RN**). Porém, juntamente com a sílica precipitou lipase não imobilizada. Então, foram realizadas diversas lavagens com acetona (3 x 5mL) e com água destilada (6 x 5mL) para solubilizar e retirar a lipase não ligada, obtendo somente a Si-Prop-RN. A secagem do sólido obtido, Si-Prop-RN, foi feita em dessecador a vácuo e, posteriormente, mantido sob refrigeração até a etapa de análise.

Figura 11 – Esquema de preparação das nanopartículas de sílica com a lipase ligada (Si-Prop-RN).

A figura 11 é somente uma representação esquemática de como a lipase se liga nas nanopartículas de sílica (SiO_2). Os grupos presentes na lipase mais prováveis para fazer a ligação com a SiO_2 são os grupos amino e os sulfidrilas. Outro ponto importante é que há mais de uma lipase ligada em cada nanopartícula de SiO_2 . Porém, a determinação de quantidade exata seria difícil. Entretanto, no decorrer do trabalho será discutida a porcentagem estimada de lipase em cada sistema.

3.7 – Caracterização morfológica

3.7.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras das nanopartículas de SiO₂ foram suspensas em 2-propanol e, após sonicadas, foram depositadas (algumas gotas) em suportes de alumínio. As fotomicrografias de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP), em um equipamento Zeiss Leo 440 (Cambridge, England) com detector Oxford, operando com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com 10nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento da análise.

3.7.2 – Microscopia de varredura de força atômica (AFM)

As nanopartículas de SiO₂ contendo lipase foram dispersas em uma solução polimérica de 4% (polivinil pirrolidona, MM: 29000 g mol⁻¹; Aldrich) em 2-propanol. Em seguida, foi feito um filme fino em placas de vidro de dimensões de 22x22mm (Menzel-Gläser # 1,5). A preparação do filme foi feita por *spin-coating* e as medidas realizadas no equipamento NanoSurf®, em ambiente de ultravácuo. Os *cantilevers* usados foram do tipo TAP 190 Al-G. A frequência de ressonância e a amplitude de vibração usadas foram de 179.2kHz e 100.1mV, respectivamente. O modo de operação do *cantilever* foi de não-contato e as imagens foram adquiridas com 512 pixels com 3 segundos por linha e analisadas com o programa easyScan 2 Controller da NanoSurf®.

3.8 – Microscopia de fluorescência confocal

3.8.1 – Preparação das amostras

As nanopartículas de SiO₂ contendo lipase foram dispersas em uma solução polimérica de 4% (polivinil pirrolidona, MM: 29000 g mol⁻¹; Aldrich) em 2-propanol. Em seguida, foi feito um filme fino em um suporte do tipo placa Petri, com dimensões de 35 x 10mm (Ted Pella # 1,5). A preparação do filme foi feita por *spin-coating* e as medidas de

microscopia de fluorescência confocal foram realizadas antes (amostras denominadas como branco) e após a adição do substrato. A concentração dos substratos (derivados de quinizarina) foi da ordem de 10^{-7} a 10^{-10} mol L⁻¹ para as medidas de microscopia de fluorescência confocal. Os cálculos de propagação de erro foram feitos para as diversas diluições. O erro foi propagado desde a massa medida até a última diluição e estão apresentados a seguir.

Derivado DAQ – solução de partida: $2,00 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

Diluições: $2,0 \times 10^{-5} \pm 5,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-7} \pm 9,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-9} \pm 1,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-10} \pm 1,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹

Derivado DBQ – solução de partida: $2,00 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

Diluições: $2,0 \times 10^{-5} \pm 5,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-7} \pm 9,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-9} \pm 1,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹
 $2,0 \times 10^{-10} \pm 1,7 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹

Derivado DHQ – solução de partida: $2,1 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

Diluições: $2,1 \times 10^{-5} \pm 5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹
 $2,1 \times 10^{-7} \pm 9,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹
 $2,1 \times 10^{-9} \pm 1,3 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹
 $2,1 \times 10^{-10} \pm 1,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹

Derivado DOQ – solução de partida: $2,0 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

Diluições: $2,0 \times 10^{-5} \pm 5,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

$2,0 \times 10^{-7} \pm 9,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

$2,0 \times 10^{-9} \pm 4,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

$2,0 \times 10^{-10} \pm 8,2 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$

A adição dos substratos foi feita sobre o filme, imediatamente antes das medidas, com o auxílio de uma micropipeta. O volume adicionado do substrato em estudo foi de 1000 μL .

3.8.2 – *Imagens e gráficos de contagem*

A aquisição das imagens foi feita em uma plataforma, utilizando um microscópio confocal. Esta foi montada em nosso laboratório e tem como base um microscópio invertido, modelo IX71 (Olympus), com um controlador piezoelétrico digital (PI models E-710.3CD e P-517.3CD) capaz de fazer varredura nanométrica. A excitação da amostra provém um laser de 532nm CW (Verdi, operando em baixa intensidade, 10mW). Em seguida, a excitação foi convertida em um feixe de luz circularmente polarizada usando uma placa de $\frac{1}{4}$ de onda de ordem zero (Del Mar Photonics) e direcionado sob a amostra com uma objetiva, UPLFLN 40X da Olympus, ou com uma objetiva com imersão em óleo, 60X N.A. 1,35 da Olympus. O sinal de emissão foi separado do laser de excitação por um dicróico (Chroma z405lp e z532lp) e por filtros de Notch (Semrock NF02-405U-25 e NF01-532U-25). Para excitação com 2-fótons, as amostras foram excitadas com pulsos de laser Mira 900 Ti:Safira (150 fs – 76 MHz) (Coherent Mira 900), o qual é bombeado por um laser de diodo (Coherent, Verdi 5W) gerando 800nm. A frequência do pulso do laser foi reduzida para 4MHz por meio de um selecionador de pulso (*pulse picker*), Conoptics. Um cubo dicróico Chroma (E750sp-2p com 700dcspxr) e um filtro de Notch (Semrock NF01-808U-25) foram usados na linha confocal do microscópio para experimentos com excitação de 2-fótons. A detecção por contagem de fótons utiliza detector pontual do tipo APD, (fotodiodo tipo avalanche) de módulo SPCM-AQR-14 da Perkin Elmer. Este detector 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. E, para a geração de imagem, sinais TTL são coletados com uma placa de contagem NI 6601 e transferidos para o computador usando um programa de controle de varredura em 2D, escrito em C[#]. Os decaimentos de fluorescência foram feitos pela técnica de contagem de fótons, usando uma placa de contagem da Becker & Hilck 140, com luz de excitação pulsada, sincronizada por um fotodiodo da PicoQuant, modelo TDA 200. Um esquema da instrumentação está ilustrado na figura 12.

Figura 12 – Esquema da instrumentação construída no laboratório de Fluorescência Molecular: $\lambda/4$ = placa de $\frac{1}{4}$ de onda de ordem zero; XYZ = Nanoposicionador; APD = Fotodiodo Avalanche; IX71 = Microscópio invertido; PC = microcomputador.

(A)

(B)

Figura 13 – (A) Fotografia dos equipamentos construídos no Grupo de Fluorescência Molecular. (B) Detalhes da linha de detecção.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado utilizando um capilar de vidro introduzido no equipamento Modelo PF 1000, Indústria e Comércio Eletro-Eletrônica Gehaka LTDA. Este utiliza um sistema elétrico de aquecimento que permite o aumento gradual e preciso e preciso da temperatura e um artefato óptico (jogo de lentes e/ou objetivas) que facilitam a visualização da temperatura de fusão de pequeníssimas quantidades do sólido. A determinação foi feita em duplicata.

Os intervalos de ponto de fusão determinados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Intervalos médios do ponto de fusão dos derivados da quinizarina.

Compostos	Intervalo médio (°C)
Quinizarina	180 – 183
DAQ	194 – 198
DBQ	108 – 110
DHQ	75 – 77
DOQ	67 – 70

O intervalo do ponto de fusão da quinizarina na literatura é de 200 – 203 °C [70], estando próximo do valor determinado na tabela 2. Para os demais derivados, como são compostos inéditos não há referência na literatura. Foi observada uma diminuição no intervalo do ponto de fusão com o aumento da cadeia alquílica, ou seja, ao aumento do caráter de parafina.

4.1 – Caracterização estrutural

Os compostos preparados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H -RMN) e de infravermelho.

Os espectros de ^1H -RMN da quinizarina e de seus derivados foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e estão representados a seguir.

Figura 14 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz da quinizarina em CDCl_3 .

^1H NMR (CD_6Cl_3): 12.9ppm (s, 2H); 8.3ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.8ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.3ppm (s, 2H).

Figura 15 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DAQ em CDCl_3 .

DAQ: ^1H NMR (CDCl_3):

Aromáticos: 8.2ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.7ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.3ppm (s, 2H);

Alifáticos: 2.5ppm (s, 6H).

Figura 16 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DBQ em CDCl_3 .

DBQ: ^1H NMR (CDCl_3):

Aromáticos: 8.2ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.7ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.3ppm (s, 2H);

Alifáticos: 2.8ppm (t, $J = 8\text{Hz}$, 4H); 1.9ppm (sext, $J = 8\text{Hz}$, 4H); 1.1ppm (t, $J = 7\text{Hz}$, 6H).

Figura 17 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DHQ em CDCl_3 .

DHQ: ^1H NMR (CDCl_3):

Aromáticos: 8.2ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.7ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.2ppm (s, 2H);

Alifáticos: 2.8ppm (t, $J = 6\text{Hz}$, 4H); 1.9ppm (qt, $J = 8\text{Hz}$, 8H); 1.6ppm (m, 4H); 0.98ppm (t, $J = 6\text{Hz}$, 6H).

Figura 18 – Espectro de ^1H -RMN 200MHz do derivado DOQ em CDCl_3 .

DOQ: ^1H NMR (CDCl_3):

Aromáticos: 8.2ppm (dd, $J = 4\text{Hz}$, 2H); 7.7ppm (dd, $J = 2\text{Hz}$, 2H); 7.2ppm (s, 2H);

Alifáticos: 2.8ppm (t, $J = 8\text{Hz}$, 4H); 1.9ppm (qt, $J = 7\text{Hz}$, 4H); 1.4ppm (m, 16H); 0.92ppm (t, $J = 6\text{Hz}$, 6H).

Os espectros de ^1H RMN dos produtos são perfeitamente compatíveis com as estruturas dos mesmos e certificam a obtenção dos substratos para o estudo enzimático.

Os espectros de infravermelho da quinizarina e de seus derivados foram feitos em pastilha de brometo de potássio (KBr).

Figura 19 – Espectro de infravermelho da quinizarina em pastilha de KBr.

Figura 20 – Espectro de infravermelho da quinizarina e de seus derivados em pastilha de KBr.

O espectro da quinizarina apresentou bandas em 1639 cm^{-1} referente à formação da ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de oxigênio do C=O e o hidrogênio do OH nas posições C-1 e C-4 [26]; em 1590 cm^{-1} devido à ligação de cetona com dois anéis aromáticos (Ar-C=O-Ar); em 795 cm^{-1} referente à ligação de antraceno substituído. E as bandas esperadas para a região de 3000 cm^{-1} referente à ligação O-H (estiramento) não

ocorreram no espectro da quinizarina devido à presença da ligação intramolecular de hidrogênio na mesma.

Os espectros dos derivados da quinizarina apresentaram bandas em 2873 / 2963 / 3073 cm^{-1} referente ao estiramento sp^3 da ligação C-H de alcano; em 1667 / 1776 cm^{-1} atribuídas à ligação de éster (C=O) e em 1187 / 1265 / 1334 cm^{-1} também devidas às ligações de éster (C-O) [54]. Considerando os espectros de ^1H -RMN e de infravermelho pode-se concluir que a preparação e a purificação dos derivados da quinizarina foram realizadas com grande êxito.

4.2 – Caracterização fotofísica

4.2.1 – Espectros de absorção e emissão de fluorescência estacionária

Os espectros de absorção eletrônica da quinizarina e de seus derivados foram feitos em ciclo-hexano, hexano e decalina, figura 21. Nestes solventes, os derivados apresentaram bandas na região do ultravioleta em torno de 330nm, enquanto que a quinizarina absorve mais na região do visível, com máximo de absorção em 480nm, em concordância com os resultados apresentados [31].

Figura 21 – Espectro de absorção da quinizarina (Qz) (—) e seus derivados (DAQ, DBQ, DHQ, DOQ) (---) em (A) ciclo-hexano, (B) hexano e (C) decalina, concentração aproximada dos compostos: $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para todos os solventes utilizados, temperatura ambiente.

O deslocamento da banda de absorção dos derivados com relação à quinizarina ocorre devido à quebra da ligação de hidrogênio intramolecular. Além disso, os derivados têm o estado $n\pi^*$ com energia mais baixa do que a quinizarina como pode ser verificado pela presença uma absorção fraca na região de 400nm que confere aos produtos uma coloração amarela clara.

Os derivados de quinizarina não são fluorescentes ($\phi_f < 10^{-4}$), quando excitados em seu máximo de absorção. Já, a quinizarina é um composto altamente fluorescente e apresenta uma banda estruturada de emissão devido à presença de tautômeros na solução, figura 22.

Figura 22 – Estruturas tautoméricas da quinizarina.

Os espectros de emissão de fluorescência da quinizarina e seus derivados estão representados a seguir.

Figura 23 – Espectro de emissão da quinizarina ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{nm}$) e seus derivados ($\lambda_{\text{ex}} = 330\text{nm}$) em (A) ciclo-hexano, (B) hexano e (C) decalina, $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparativamente à quinizarina, seus derivados não apresentam intensidade de fluorescência facilmente mensurável. Uma explicação para esta perda de intensidade (fluorescência) dos derivados é a quebra da ligação de hidrogênio intramolecular presente na quinizarina. Esta ligação de hidrogênio promove maior caráter aromático à molécula devido à formação de mais dois anéis *quasi*-aromáticos, conforme ilustrado na figura 24.

Figura 24 – Estrutura da quinizarina ilustrando a formação dos dois anéis *quasi*-aromáticos com interação do tipo RAHB.

Além disso, a ligação intramolecular de hidrogênio aprisiona o par de elétrons não-ligantes da carbonila evitando que o estado $n\pi^*$ tenha energia baixa o suficiente para resultar em um cruzamento intersistemas. Consequentemente a energia absorvida é liberada por emissão radiativa (fluorescência). E ao contrário da quinizarina, seus derivados não apresentam ligação intramolecular de hidrogênio e seu estado excitado perde energia por cruzamento intersistemas (emissão não-radiativa) [31].

4.2.2 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência

O rendimento quântico de emissão de fluorescência de uma molécula é a razão entre a intensidade de luz emitida pela intensidade de luz absorvida. Para determiná-lo é necessário escolher um padrão com rendimento quântico conhecido. A determinação é feita pela comparação da intensidade integrada num dado comprimento de onda da amostra com o padrão. A densidade óptica deve ser mantida em torno de 0,05, para evitar efeitos de filtro interno. A equação utilizada para o cálculo do rendimento quântico está representada a seguir:

$$\phi = \phi_{\text{padrão}} \cdot \frac{I_{\text{amostra}}}{I_{\text{padrão}}} \cdot \frac{DO_{\text{padrão}}}{DO_{\text{amostra}}} \cdot \frac{\eta^2_{\text{amostra}}}{\eta^2_{\text{padrão}}} \quad \text{equação 2}$$

na qual, $\phi_{\text{padrão}}$ é o rendimento quântico do padrão; I_{amostra} e $I_{\text{padrão}}$ são as intensidades de emissão integradas dos espectros de emissão da amostra e do padrão obtidos nas mesmas condições experimentais; DO_{amostra} e $DO_{\text{padrão}}$ são as densidades ópticas integradas dos

espectros de absorção da amostra e do padrão; η_{amostra} e $\eta_{\text{padrão}}$ são os índices de refração dos solventes utilizados para a amostra e para o padrão. Nesta equação assume-se que o padrão e a amostra são excitados no mesmo comprimento de onda, para que não seja necessária correção da intensidade de excitação em diferentes comprimentos de onda [53].

Os valores de rendimento quântico dos derivados da quinizarina foram estimados usando o padrão sulfato de quinina (0,1M em H_2SO_4), $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{nm}$, $\phi = 0,57$. Para a quinizarina foi utilizado o padrão rodamina B em etanol, $\lambda_{\text{ex}} = 510\text{nm}$, $\phi = 0,49$. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 2.

Tabela 3 – Rendimento quântico de emissão de fluorescência da quinizarina e seus derivados.

ϕ	n-hexano	ciclo-hexano	Decalina
Qz	$7,4 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$
DAQ	4×10^{-5}	1×10^{-5}	7×10^{-5}
DBQ	2×10^{-5}	6×10^{-5}	7×10^{-5}
DHQ	2×10^{-5}	1×10^{-5}	2×10^{-5}
DOQ	4×10^{-5}	9×10^{-5}	7×10^{-5}

Pelos dados da tabela acima se pode concluir que os substratos preparados (ésteres de quinizarina) são praticamente não fluorescentes, pois comparados a quinizarina, os rendimentos de emissão de fluorescência são da ordem de 10^3 vezes menores que o precursor quinizarina ($\phi = 0,1$).

4.3 – Cinética enzimática

4.3.1 – Determinação da quantidade de enzima presente na lipase CALB (Novozyme® 435)

A determinação da quantidade de enzima presente na lipase CALB foi feita anteriormente em nosso grupo em conjunto com Massucatto, 2009, [50] por meio de análise elementar do material. A lipase é constituída de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, enquanto que o material de suporte, polimetil metacrilato, é formado

apenas por carbono, oxigênio e hidrogênio. Assim pela fração da massa de nitrogênio presente na enzima foi possível determinar a massa da lipase no suporte. Esta caracterização também poderia ter sido feita utilizando a fração do enxofre, porém sua porcentagem em massa é muito pequena. Então, a porcentagem de lipase no suporte foi determinada utilizando a fração de nitrogênio presente na amostra. O valor obtido foi de 7,1% (m/m) de lipase no suporte [50].

4.3.2 – Estudo macroscópico da hidrólise enzimática

A enzima utilizada neste estudo foi a lipase CALB do fungo *Candida antarctica*. Esta imobilizada por adsorção em partículas esféricas de polimetil metacrilato é conhecida comercialmente como Novozym 435®. A CALB é constitída por 317 resíduos de aminoácidos e possui massa molar de 33kDa [55]. Esta lipase pertence à família das hidrolases e sua tríade catalítica é composta pelos aminoácidos serina 105, ácido aspártico 187 e histidina 224. O ciclo catalítico inicia-se com a abstração do próton da hidroxila da serina 105 pelo nitrogênio da histidina 224, o que aumenta seu caráter nucleofílico. A alcoxila, por sua vez, realiza um ataque nucleofílico a carbonila do éster do substrato associado ao sítio catalítico. Este processo leva a formação de um intermediário tetraédrico composto pela serina 105 e pelo éster. A eliminação do álcool ocorre na segunda etapa, com o restabelecimento da carbonila e a transferência do próton do íon imidazolínio à alcoxila, que deixa o sítio ativo na forma de álcool. Ao éster formado pela serina e o ácido carboxílico proveniente do substrato dá-se o nome de enzima acilada. A seguir, uma molécula de água adiciona-se à carboxila da enzima acilada, formando um segundo intermediário tetraédrico. O ácido carboxílico deixa a enzima quando este segundo intermediário tem sua carboxila restaurada, e com a saída da alcoxila da serina 105 que retira o próton do íon imidazolínio formado na etapa anterior, restaurando assim os resíduos de aminoácido como no início. Este mecanismo está representado na figura a seguir.

Figura 25 – Esquema do mecanismo enzimático da lipase CALB. Ser: serina; Asp: ácido aspártico; His: histidina [55].

Os derivados da quinizarina sofrem hidrólise na presença da lipase CALB (Novozyme® 435) e em solventes apolares [50]. Um esquema desta reação está representado na figura 26. O monitoramento da reação de hidrólise usando a CALB pode ser feito por medidas de espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência na fase solvente em contato com as partículas contendo a enzima.

Figura 26 – Estruturas moleculares dos substratos diéster (QzR_2), monoéster (QzR) e a quinizarina (Qz) em um processo enzimático de duas etapas.

A concentração dos derivados foi de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o estudo e a massa da CALB variando de 10 a 50mg. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram adquiridos em intervalos de tempo. Um típico dado deste experimento está mostrado a seguir, figura 27.

Figura 27 – Monitoramento da reação de hidrólise em função do tempo do derivado DHQ em hexano. $[DHQ] = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $m_{\text{CALB}} = 20\text{mg}$, $T = 298\text{K}$.

Os demais derivados apresentaram mesmo comportamento espectroscópico, independentemente do solvente utilizado, ciclo-hexano, hexano ou decalina.

Considerando os espectros de absorção foi possível observar que a lipase realmente age sobre a ligação de éster do derivado, quebrando-a. Isso pode ser comprovado pela presença do ponto isobéstico em 370nm, denotando a transformação de uma espécie em outra; neste caso, do derivado ($\lambda_{\text{máx}} = 330\text{nm}$) em quinizarina ($\lambda_{\text{máx}} = 484\text{nm}$), conforme os espectros na figura 26.

Espectros de emissão de fluorescência *versus* tempo também foram utilizados para monitorar a reação de hidrólise dos derivados. O comprimento de onda de excitação utilizado foi o da quinizarina ($\lambda_{\text{ex}} = 484\text{nm}$). No início da reação não há emissão de fluorescência, porém com o progresso da mesma há um aumento na intensidade de emissão devido à formação da quinizarina. Este comportamento está ilustrado com o gráfico na figura 28.

Figura 28 – Espectros de emissão de fluorescência obtidos do monitoramento da reação de hidrólise em função do tempo do derivado DHQ em hexano. $[DHQ] = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 484\text{nm}$, $m_{\text{CALB}} = 20\text{mg}$, $T = 298\text{K}$, agitação constante.

Contudo, para comprovar que a hidrólise foi realizada totalmente pela lipase e não pela água presente no meio (reação térmica de hidrólise química considerando o meio reacional solvente + água) foi feito um experimento no qual foi monitorado o derivado da quinizarina no meio solvente. Para isso foram adquiridos espectros de emissão de fluorescência *versus* tempo da mesma forma que para a lipase. Os dados obtidos estão representados na figura 29.

Figura 29 – Monitoramento da reação do derivado DHQ no meio solvente. ($V_{H_2O} = 50\mu L$, $\lambda_{ex} = 484nm$).

No intervalo de tempo observado não houve alteração na intensidade de emissão de fluorescência. Assim, conclui-se que, mesmo que a reação de hidrólise química dos derivados ocorra, sua contribuição é irrisória frente à ação de hidrólise da lipase.

Com base nos resultados obtidos na figura 28 foi possível obter uma curva cinética da reação de hidrólise por meio da integração de cada espectro de emissão em função do tempo. A curva da progressão da cinética de hidrólise apresentou comportamento sigmoidal para todos os derivados, figura 30.

Figura 30 – Acompanhamento da reação de hidrólise do DHQ em hexano. (Ilustração do comportamento sigmoidal).

Considerando este resultado foi proposto um modelo cinético da hidrólise dos derivados da quinizarina. Este compreende a reação de hidrólise em duas etapas sequenciais, considerando que o sítio catalítico da lipase acomoda apenas um éster por ciclo. O modelo pode ser esquematizado como mostrado na figura 31.

Figura 31 – Modelo cinético proposto para as reações sequenciais. Para a identificação das espécies vide figura 26.

Neste modelo QzR₂ corresponde ao diéster, QzR₁ ao monoéster, Qz à quinizarina, [EQzR₂] ao complexo lipase-substrato formado pelo diéster e [EQzR] pelo complexo da lipase-substrato formado pelo monoéster. k₁ e k₂, k₋₁ e k₋₂ representam a constante de associação e dissociação do monoéster e diéster, respectivamente. E as constantes

catalíticas da primeira e da segunda etapa de hidrólise são dadas por k_{C1} e k_{C2} . A solução deste mecanismo com aproximação do estado estacionário para as espécies intermediárias $[EQzR_2]$ e $[EQzR]$ podem ser expressas como uma função da concentração do produto final (quinizarina) pela equação:

$$Qz(t) = \frac{QzR_2^0}{(\alpha - \beta)} [\alpha (1 - \exp[-\beta t]) + \beta (\exp[-\alpha t] - 1)]$$

equação 3

na qual, os parâmetros α e β são definidos como: $\alpha = \frac{K_{C2}[E]}{K_{M2}}$ e $\beta = \frac{K_{C1}[E]}{K_{M1}}$.

A constante de Michaelis-Menten para cada etapa da hidrólise é expressa geralmente como: $K_M = \frac{k_{-n} + K_{Cn}}{k_n}$. Mais especificamente podemos escrevê-la como:

$$K_{M1,2} = \frac{k_{-1,2} + K_{C1,2}}{k_{1,2}} \quad \text{equação 4}$$

A função expressa pela equação $Qz(t)$, Eq. 3, descreve a cinética com comportamento sigmoidal de Qz com o tempo. Embora sua explicação para os dados experimentais tenha se aplicado, os valores ajustados obtidos de α e β se apresentaram muito próximos um do outro. Então, como constatação experimental, temos que a constante de associação, dissociação e de catálise enzimática do mecanismo da dupla hidrólise são similares na primeira e na segunda etapa hidrolítica; uma condição que era esperada devido à simetria dos substratos diésteres neste estudo. Entretanto, esta situação deu uma condição imprópria para a equação $Qz(t)$, Eq. 3. Sob esta restrição para as constantes de velocidade, uma expressão limitante foi derivada de um sistema de equações de velocidade (Apêndice 1), e a dependência do tempo com $Qz(t)$ tornou-se uma única função de constante de velocidade de primeira ordem ($\alpha = \beta = k$) e foi dada por:

$$[Qz](t) = QzR_2^0 (1 - (1 + kt) \exp(-kt)) \quad \text{equação 5}$$

na qual, $k = \frac{K_C[E]}{K_M}$ e $K_M = K_{M1} = K_{M2}$.

A fim de analisar os dados experimentais, assumimos que a intensidade de emissão de fluorescência $I(t)$ é proporcional a $[Qz](t)$, produzindo:

$$I(t) = I_{\infty} (1 - (1 + kt) \exp(-kt)) \quad \text{equação 6}$$

na qual I_{∞} é a intensidade de emissão de fluorescência na saturação (limite longo de tempo) ou o máximo de intensidade observada.

O resultado obtido na condição de um estado estacionário é uma aproximação com validade restrita, considerando que não há uma forte competição entre os substratos QzR_2 e QzR . No entanto, uma comparação entre a Eq. 6 com uma solução numérica do sistema de equação de velocidade foi realizada. A concentração normalizada de $Qz(t)$ (proporcional a I/I_0) é representada apenas pela solução do estado estacionário na condição de K_M com valores altos e k_c com valores baixos (Fig. 32). Entretanto, quando reduzimos o valor de K_M , a condição do estado estacionário falha, como ilustrado na Fig. 33. As simulações numéricas foram feitas de acordo com o mecanismo cinético duplo de Michelis-Menten com integração das equações de velocidade usando o método de Runge-Kutta em quarta ordem.

Figura 32 – Simulação da cinética enzimática da formação do produto Qz assumindo que: $QzR_2^0 = 1,0$; $E^0 = 0,5$; $k_1 = 0,4$; $k_{-1} = 3,0$; $k_c = 0,1$; $K_M = 7,7$. A linha pontilhada representa a solução do estado estacionário dada pela equação 6 com parâmetro $k = 0,00645$. (o) é a solução numérica do sistema de equação de velocidade usando o método de integração de Runge-Kutta em quarta ordem. A linha contínua consiste no ajuste não linear dos pontos numéricos usando a equação 6 que fornece o parâmetro $k' = 0,00582$.

Figura 33 – Simulação da cinética enzimática da formação do produto Qz assumindo que: $QzR_2^0 = 1,0$; $E^0 = 0,5$; $k_1 = 0,7$; $k_{-1} = 3,0$; $k_c = 0,1$; $K_M = 4,4$. A linha pontilhada representa a solução do estado estacionário dada pela equação 6 com parâmetro $k = 0,0113$. (o) é a solução numérica do sistema de equação de velocidade usando o método de integração de Runge-Kutta em quarta ordem. A linha contínua consiste no ajuste não linear dos pontos numéricos usando a equação 6 que fornece o parâmetro $k' = 0,0086$.

Contudo, o que é mais importante do ponto de vista experimental é que a função dada pela equação $I(t) = I_\infty (1 - (1 + kt) \exp(-kt))$ ajusta os valores numéricos perfeitamente em todas as condições testadas (vide linha contínua nas Fig. 32 e 33). Isso significa que o parâmetro ajustado definido como k equivale a k' na condição do estado estacionário e pode ser recuperado da análise dos dados experimentais. Então, assumindo que a intensidade de fluorescência $I(t)$ é proporcional a $Qz(t)$, os resultados experimentais realmente podem ser analisados pela equação 6.

Como resultado destas simulações pode-se concluir que há uma razoável concordância entre o estado estacionário e os valores numéricos, considerando que a diferença entre os dados obtidos para a constante k está em torno de, no máximo, 20%.

Além disso, o tempo médio de reação pode ser definido como a integral ao longo do tempo referente à fração do substrato, dada por:

$$\tau = \int_0^{\infty} (1 - [Qz^0]QzR_2)dt = \int_0^{\infty} (1 + kt) \exp(-kt) dt = 2/k$$

equação 7

Os resultados experimentais da hidrólise dos derivados da quinizarina foram ajustados com a equação 6 e estão ilustrados na figura 34.

Figura 34 – Intensidades integradas normalizadas para o derivado DAQ $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 484\text{nm}$, $T = 298\text{K}$) em ciclo-hexano, hexano e decalina. O ajuste das curvas foi feito utilizando a equação 6.

Para os demais derivados foi observado o mesmo comportamento. Pelo valor de r^2 (coeficiente de correlação) nota-se que o modelo teórico se ajustou muito bem aos dados experimentais (valor de r^2 foi em média 0,98 para todas as curvas). Com isso, foi possível calcular os parâmetros cinéticos por meio do ajuste das curvas com a equação 6 para todos derivados que estão mostrados nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 4 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação ($2/k$) dos derivados da quinizarina nos solventes hexano.

DAQ			DBQ		DHQ	
m_{CALB} (mg)	k (s^{-1})	$2/k$ (min)	k (s^{-1})	$2/k$ (min)	k (s^{-1})	$2/k$ (min)
10	$2,26 \times 10^{-4}$	128	$14,5 \times 10^{-4}$	33	$11,2 \times 10^{-4}$	30
20	$4,43 \times 10^{-4}$	75	$21,2 \times 10^{-4}$	16	$14,9 \times 10^{-4}$	22
30	$5,54 \times 10^{-4}$	50	$32,6 \times 10^{-4}$	10	$19,2 \times 10^{-4}$	17
40	$4,55 \times 10^{-4}$	73	$30,9 \times 10^{-4}$	11	$18,1 \times 10^{-4}$	18
50	$5,65 \times 10^{-4}$	59	$39,9 \times 10^{-4}$	9,3	$21,4 \times 10^{-4}$	15

Tabela 5 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação (2/k) dos derivados da quinizarina nos solventes ciclo-hexano.

m_{CALB} (mg)	DAQ		DBQ		DHQ	
	k (s^{-1})	2/k (min)	k (s^{-1})	2/k (min)	k (s^{-1})	2/k (min)
10	$3,03 \times 10^{-4}$	110	$36,1 \times 10^{-4}$	9,3	$1,09 \times 10^{-4}$	305
20	$5,26 \times 10^{-4}$	53	$55,9 \times 10^{-4}$	5,9	$2,24 \times 10^{-4}$	148
30	$4,68 \times 10^{-4}$	71	$78,6 \times 10^{-4}$	4,3	$3,34 \times 10^{-4}$	99
40	$6,69 \times 10^{-4}$	50	103×10^{-4}	3,2	$2,58 \times 10^{-4}$	129
50	$9,32 \times 10^{-4}$	36	144×10^{-4}	2,3	$3,04 \times 10^{-4}$	109

Tabela 6 – Constantes cinéticas (k) e tempo médio de reação (2/k) dos derivados da quinizarina nos solventes decalina.

m_{CALB} (mg)	DAQ		DBQ	
	k (s^{-1})	2/k (min)	k (s^{-1})	2/k (min)
10	$2,41 \times 10^{-4}$	138	$19,6 \times 10^{-4}$	17
20	$3,39 \times 10^{-4}$	98	$27,7 \times 10^{-4}$	12
30	$5,26 \times 10^{-4}$	56	$30,1 \times 10^{-4}$	11
40	$6,28 \times 10^{-4}$	53	$43,3 \times 10^{-4}$	7,8
50	$6,56 \times 10^{-4}$	51	$48,1 \times 10^{-4}$	6,9

Com base nestes dados pode-se observar uma mudança no valor da constante cinética de acordo com a quantidade de enzima adicionada. O aumento da constante k foi, aproximadamente, proporcional à quantidade de lipase adicionada e similar nos três solventes utilizados.

Figura 35 – Curvas das constantes obtidas da reação de hidrólise dos derivados da quinizarina em função da quantidade de enzima CALB adicionada nos solventes utilizados. **(A)** – DAQ; **(B)** – DBQ; **(C)** – DHQ.

Outro ponto que pode ser relatado é de a reação não estar no limite da difusão controlada, pois a constante de velocidade k foi similar em hexano, ciclo-hexano e decalina, embora a viscosidade do solvente aumente nesta série.

A hipótese do estado *quasi*-estacionário é uma aproximação que permite uma solução de forma analítica ao mecanismo duplo de Michaelis-Menten [46]. Uma descrição aceitável para a cinética enzimática observada aqui é de que a fase orgânica age como um

reservatório de substratos que alimenta constantemente a fase da enzima suportada, na qual os complexos formados permanecem na condição do estado *quasi*-estacionário. Por outro lado, a baixa concentração de substratos em solução e sua alta solubilidade no solvente orgânico proporcionam um regime de concentração no qual a concentração local de enzima suportada é maior que a concentração dos substratos adsorvidos, $[E] > [QzR_2, QzR]$. Assim, nestas condições, $[QzR_2]$ diminuirá exponencialmente [57, 58]. O sistema de reação poderia então ser reduzido a um mecanismo sequencial de primeira ordem com mesma constante de velocidade k para a primeira e a segunda etapa. Outro mecanismo possível poderia ser a reação direta do complexo enzimático $[EQzR_2]$ para $[EQzR]$ sem a dissociação/dessorção do intermediário monoéster QzR para o meio, contrastando com o mecanismo proposto na figura 31 (mecanismo enzimático). Se esta situação for considerada na aproximação do estado estacionário, o tempo de evolução do aumento da concentração de $Qz(t)$ seria uma curva de saturação expressa por $I(t) = I_{\infty} (1 - \exp(-\mu t))$, na qual μ é o parâmetro de velocidade definido pelo modelo exposto no Apêndice 1. Porém, esta equação não concorda com o formato da curva experimental (sigmoideal) observada nos dados obtidos. Além disso, o processo de dissociação do monoéster no sítio de reação da enzima parece ser uma etapa importante na cinética investigada. Pois a alta solubilidade dos substratos e dos produtos nos solventes utilizados permite uma fácil desorção das espécies da fase da enzima suportada, onde foi realizado o monitoramento do produto (Qz) por medidas de sua fluorescência.

4.4 – Estudo da ação enzimática por microscopia de fluorescência confocal

4.4.1 – Caracterização morfológica

4.4.1.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização estrutural das nanopartículas de sílica contendo a lipase adsorvida (Si-RN) e a lipase ligada (Si-Prop-RN) foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em todos os casos, as partículas formaram esferas praticamente monodispersas.

As nanopartículas de SiO_2 preparadas pelo método de Stöber apresentaram diâmetro médio de $200 \pm 13\text{nm}$, figura 36.

Figura 36 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 preparadas pelo método de Stöber, $d = 200 \pm 13\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.

As nanopartículas com lipase adsorvida (Si-RN) e com a lipase ligada (Si-Prop-RN) apresentaram diâmetro médio de $180 \pm 14\text{nm}$ e $196 \pm 14\text{nm}$, respectivamente, como ilustrado nas figuras 37 e 38.

Figura 37 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 com a lipase adsorvida (Si-RN) preparadas pelo método de Stöber, $d = 180 \pm 14\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.

Figure 38 – Imagem de MEV das nanopartículas de SiO_2 com a lipase ligada (Si-Prop-RN) preparadas pelo método de Stöber, $d = 196 \pm 13\text{nm}$. Partículas dispersas em 2-propanol e depositadas no suporte por evaporação.

Neste ponto é importante mencionar que para a aquisição das imagens anteriores, Fig. 36, 37 e 38, as partículas foram dispersas em 2-propanol e não em solução polimérica. Pois, no caso das partículas utilizadas na investigação enzimática por microscopia de fluorescência confocal foi utilizado um filme fino das mesmas em solução polimérica (PVP em 2-propanol).

Os valores obtidos indicam que a inclusão da enzima (adsorvida ou ligada) não modifica a dimensão das partículas de sílica usadas como suporte. Porém, nota-se que as nanopartículas de sílica com lipase ligada se apresentam mais aglomeradas devido, provavelmente, a interação de superfície mediadas pela enzima e o agente ligante.

4.5 – Determinação da quantidade de enzima presente nos sistemas Si-RN e Si-Prop-RN

Para determinar a porcentagem de lipase incorporada às nanopartículas de sílica foram feitas medidas de análise elementar (CHN). Esta determinação foi feita para os dois sistemas estudados: Si-RN (lipase adsorvida na nanopartícula de sílica) e Si-Prop-RN (lipase ligada na nanopartícula de sílica).

A lipase é constituída de carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e enxofre, enquanto que o material do suporte é formado apenas por carbono, oxigênio, hidrogênio e silício. Assim, sabendo a fração em massa de nitrogênio presente na lipase foi possível calcular a porcentagem em massa de lipase presente nos sistemas preparados (Si-RN e Si-Prop-RN).

As análises de CHN dos sistemas Si-RN e Si-Prop-RN foram feitas na Central Analítica do IQ – Usp, São Paulo, e os resultados obtidos estão na tabela a seguir.

Tabela 7 – Valores médios da porcentagem de nitrogênio presente nos sistemas estudados.

	Si-RN	Si-Prop-RN
% N	1,14	0,47

A quantidade da lipase presente nos sistemas Si-RN e Si-Prop-RN foi calculada utilizando como parâmetro a porcentagem de nitrogênio da própria lipase *Rhizopus niveus* obtida por análise elementar. O valor de nitrogênio na lipase foi de 5%. Sendo assim, temos que a massa de nitrogênio nos sistemas corresponde a 0,05x. Então, a porcentagem de lipase encontrada foi de 22,9% (m/m) e 9,5% (m/m) para Si-RN e Si-Prop-RN, respectivamente.

Com estes resultados podemos concluir que houve maior incorporação da lipase no sistema em que a mesma está adsorvida (Si-RN). De fato, no processo de associação covalente, a porcentagem de enzima irá depender da fração de superfície que foi funcionalizada com o agente cloro-silano e sua posterior reatividade com os resíduos NH_2 ou SH da enzima.

4.6 – Microscopia de fluorescência confocal

Para a aquisição das imagens de microscopia de fluorescência confocal as partículas foram dispersas em solução polimérica de PVP em 2-propanol e as placas foram preparadas por *spin-coating*. Este filme foi utilizado a fim de minimizar efeitos causados pela diferença de índice de refração entre suporte/ar/partícula. Neste caso, a presença do filme torna o caminho do feixe de luz (laser) homogêneo, promovendo uma melhora nas condições das medidas de microscopia. As imagens foram obtidas antes e após a adição do substrato. Antes da adição o sistema não apresentou sinal de fluorescência, tanto para o sistema Si-RN como para o Si-Prop-RN. Uma imagem típica está representada na figura 39, apresentando unicamente o ruído de fundo.

Figura 39 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal antes da adição do substrato, (contagem média: 60cps; equivalente a contagem de fundo).

As cores observadas nas imagens são artificiais e alteradas de acordo com a escala de intensidade. Assim, cada vez que é detectado um ponto com maior intensidade de fluorescência as cores são re-escaladas de acordo com a barra de cores presente na lateral esquerda das imagens (cor preta: menor intensidade; cor rosa: maior intensidade). Esta re-escala é feita pelo próprio programa de aquisição de imagens. A resolução no limite confocal é dada pelo comprimento de onda da fonte de excitação utilizada dividido por dois.

No caso do laser de 532nm a resolução é 266nm, ou seja, a menor separação entre dois pontos luminosos no limite confocal (de difração) será 266nm.

Após a adição do substrato sobre o filme contendo nanopartículas de SiO_2 com a lipase ocorre a hidrólise dos derivados da quinizarina e é possível observar a formação sítios micrométricos altamente fluorescentes cercados de pequenas regiões de baixa intensidade. Isto ocorre devido à formação do produto (quinizarina) onde a lipase está presente. Este comportamento foi apresentado para os dois sistemas estudados, o das nanopartículas com a lipase adsorvida e com a lipase ligada quimicamente.

Além disso, foram feitas medidas do sistema sílica pura/filme/substrato para verificar que os sítios fluorescentes obtidos eram provenientes da hidrólise enzimática. As imagens obtidas não apresentaram sítios fluorescentes, indicando que estes são provenientes somente da hidrólise enzimática. As imagens para o sistema com a lipase adsorvida (Si-RN) estão ilustradas abaixo.

DAQ: 210cps

DBQ: 300cps

DHQ: 200cps

DOQ: 300cps

Figura 40 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal do sistema Si-RN (lipase adsorvida na SiO_2), $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano. (**cps**: contagem média por segundo da região de emissão).

Através das imagens da figura 40 não foi possível fazer a distinção entre os substratos. Todos apresentaram intensidades de fluorescência aproximadas, bem como similaridade das regiões fluorescentes em termos de agregados.

O resultado obtido para o sistema Si-Prop-RN foi semelhante ao Si-RN. As imagens estão na figura 41.

DAQ: 730cps

DBQ: 410cps

Figura 41 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal do sistema Si-Prop-RN (lipase ligada na SiO_2), $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$. Concentração dos substratos da ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, em ciclo-hexano. (cps: contagem média por segundo da região de emissão).

Os resultados apresentados pelas imagens anteriores também foram independentes dos substratos utilizados. Contudo, nos dois sistemas foi possível verificar que os derivados diesterificados da quinizarina foram convertidos em produto fluorescente (Qz); e o processo é bastante rápido em nível microscópico, ocorrendo a hidrólise imediatamente após a adição dos substratos.

Entretanto, uma questão ainda estava suspensa. Se os sistemas (Si-RN e Si-Prop-RN) são de ordem nanométrica (partícula com 200nm), como observados pelas medidas de MEV, por que nas imagens de fluorescência foram obtidas regiões de ordem micrométrica? Com o propósito de esclarecer esta dúvida foram realizadas medidas de MEV e AFM das nanopartículas de SiO_2 com lipase dispersas na solução polimérica (PVP em *isopropanol*). Em ambas as microscopias de alta resolução foi possível observar a presença de agregados isolados formados pelas nanopartículas da ordem de micrometros, o que está em certa concordância com as imagens da microscopia de fluorescência confocal. As figuras abaixo ilustram imagens típicas deste comportamento.

Figura 42 – Imagens de MEV do filme fino das nanopartículas de sílica (Si-RN) dispersas em PVP.

Figura 43 – Imagem de AFM do filme fino das nanopartículas de sílica (Si-RN) dispersas em PVP.

Assim, na resolução confocal, um agregado de várias partículas de sílica com lipase ao produzir o produto quinizarina torna-se uma região mais ampla de sinal emissão e aparece nos mapas de emissão e aparece nos mapas de fluorescência como uma região micrométrica.

Outro ponto importante, é que estas imagens de MEV indicam que os agregados das nanopartículas SiO_2 não ocorrem somente em arranjos bidimensionais (2D), mas também em três dimensões (3D). Isso significa que a agregação pode ser resultado do método de preparação, no qual a presença de pequenas quantidades de lipase é suficiente para mudar a estrutura da sílica induzindo agregação. Além disso, o polímero (PVP) usado para formar o filme com as nanopartículas SiO_2 também pode forçar a agregação das mesmas durante o processo de evaporação do solvente.

Para complementar esta caracterização de auto-agregação das partículas de sílica, medidas de microscopia de força atômica foram realizadas. Conforme os dados da figura 43, existem agregados de poucas e várias partículas praticamente isoladas.

4.6.1 – Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática dos derivados da quinizarina (Qz) na presença de SiO_2 com lipase suportada para a formação da quinizarina pode ser descrita por um processo sequencial, similar ao proposto e confirmado no estudo macroscópico com CALB e medidas de fluorescência. Primeiramente ocorre a formação de um monoéster a partir do diéster e, posteriormente a conversão para o produto final (Qz), figura 26.

Relembrando que os substratos QzR_2 e QzR são espécies que não apresentam fluorescência devido a seu estado excitado de baixa energia ter forte caráter $n\pi^*$. Por outro lado, a quinizarina apresenta uma forte emissão devido ao seu estado singlete de menor energia $\pi\pi^*$, que promove uma ressonância estendida pelas duas ligações intramoleculares de hidrogênio [59, 60].

O processo enzimático nanopartículas de sílica com lipase também pode ser explicado por duas etapas cinéticas sequenciais, pois o sítio ativo da lipase acomoda

somente um éster por ciclo catalítico. Um modelo cinético duplo de Michaelis-Menten que descreve esta reação está na figura 44.

Figura 44 – Etapas sequenciais do modelo cinético duplo do tipo de Michaelis-Menten (substratos: diéster (QzR₂), monoéster (QzR) e quinizarina (Qz)).

4.6.2 – Avaliação da ação enzimática por microscopia de fluorescência confocal

O mecanismo enzimático envolvido nas etapas de hidrólise pode ser descrito no esquema da figura 45 (similar ao mecanismo descrito anteriormente (Fig. 25), porém com diferente numeração dos resíduos do sítio ativo). Os aminoácidos responsáveis pelo sítio catalítico nesta enzima são a serina 145, a histidina 257 e o ácido aspártico 204. Esta tríade de aminoácidos reage com a carbonila do substrato, promovendo a ligação do substrato com a enzima. Cria-se uma região hidrofóbica permitindo a ligação de hidrogênio entre os resíduos próximos a tríade catalítica.

A histidina atrai o próton do grupo hidroxila da serina formando um oxiânion que se liga ao grupo carbonila e, os prótons da histidina são transferidos para o produto. O éster formado com a serina reage com a água completando a hidrólise. O nitrogênio da histidina remove o hidrogênio da água formando hidroxiânions que atacam o carbono da carbonila. O oxiânion é estabilizado pelas ligações de hidrogênio e, os elétrons são atraídos pelo carbono da carbonila formando o ácido graxo. O oxigênio da serina busca o hidrogênio da histidina para re-estabelecer as ligações de hidrogênio. O ácido aspártico tem função de atrair cargas positivas da histidina durante o tempo em que ela está protonada [12, 61].

Figura 45 – Esquema da hidrólise enzimática da lipase *Rhizopus niveus*. Ser: serina; Asp: ácido aspártico; His: histidina [61, 62].

A ação da lipase em uma única partícula de sílica ou em um agregado foi avaliada por medidas de contagem de fótons com relação ao tempo. Para isso, uma imagem foi obtida (usualmente em alguns segundos) e em seguida o foco do laser foi reposicionado no centro da região emissora com movimento do piezoelétrico. Então foi adquirido um gráfico de flutuação de contagem de fótons com o tempo. Estas medidas foram feitas para os dois sistemas, **Si-RN** e **Si-Prop-RN**, utilizando todos os derivados da quinizarina em ciclo-hexano. Uma representação destes gráficos está ilustrada na figura 46, na qual a primeira parte da curva é referente à contagem de fundo do equipamento (ruído) e a segunda parte da série temporal de contagem se refere ao sinal de emissão fluorescente da quinizarina produzida enzimaticamente. Para o tratamento dos dados que serão mostrados a seguir somente a segunda parte da série temporal foi utilizada, pois é a parte representativa do trabalho enzimático.

Figura 46 – Representação do gráfico de flutuação de contagem *versus* tempo obtido sem tratamento prévio. (Gráfico de contagem do Si-RN com o substrato C2 em ciclo-hexano. Tempo de integração = 20ms).

Um típico gráfico de contagem que indica a flutuação da intensidade de fluorescência com o tempo para os sistemas Si-RN e Si-Prop-RN com o derivado DAQ estão ilustrados nas figuras 47 e 48. Os gráficos obtidos para os demais derivados foram semelhantes aos apresentados.

Figura 47 – Gráfico de contagem de fótons *versus* tempo das nanopartículas de SiO_2 com lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DAQ (*threshold* está indicado pela linha horizontal pontilhada). Abaixo, conversão binária ON(1) – OFF(0) do gráfico de contagem. Tempo de integração = 20ms.

Figura 48 – Gráfico de contagem de fótons *versus* tempo das nanopartículas de SiO_2 com lipase ligada (Si-Prop-RN) após a adição do substrato DAQ (*threshold* está indicado pela linha horizontal pontilhada). Abaixo, conversão binária ON(1) – OFF(0) do gráfico de contagem. Tempo de integração = 20ms)

A dinâmica de desordem temporal do trabalho enzimático ocorre porque existem conformações da enzima que são muito ativas enquanto outras são inativas. Ao transitar entre estados mais ou menos ativos, uma enzima, ou um conjunto discreto de enzimas irá produzir na escala de tempo um número também discreto e com flutuação de produto. Se o produto origina o sinal de fluorescência, a flutuação no sinal é em parte um reflexo da estatística de flutuação da atividade enzimática.

A frequência do tempo de OFF (ou seja, de não trabalho enzimático) para diferentes incrementos de tempo pode ser calculado para investigar dinâmicas de relaxação OFF. Os

dois sistemas, Si-RN e Si-Prop-RN, foram analisados com relação aos gráficos de contagem observando agregados de nanopartículas, bem como nanopartículas separadas (ou agregados bem pequenos). Assim, foi possível estudar a dinâmica de relaxação OFF. As medidas para os agregados e para as partículas foram feitas com três repetições e as médias de tempo OFF foram calculadas. O gráfico abaixo mostra este estudo para os substratos utilizados com o sistema **Si-RN**.

O sinal de flutuação de contagens de intensidade de fluorescência pode ocorrer devido a vários fenômenos como, por exemplo, a estatística de Poisson na contagem de fótons, dinâmica de desordem do trabalho enzimático e pela difusão do substrato/produto dentro e fora das nanopartículas de sílica-lipase no foco do laser, figura 49.

Figura 49 – Esquema do trabalho enzimático durante a medida de microscopia de fluorescência confocal. Neste esquema S: substrato, E: lipase, Qz: quinizarina, Qz*: quinizarina no estado excitado,

: nanopartículas de sílica com a lipase incorporada.

A conversão do sinal de flutuação em ON-OFF, originalmente, é estabelecida pela dinâmica de uma única enzima, porém, o tratamento dos dados aqui apresentados consideram alguns pequenos agregados da lipase com os diferentes substratos (DAQ, DBQ, DHQ e DOQ). Como regra particular, definimos que o estado ON é tido quando a intensidade de contagem está acima de um limite (*threshold*). Este, por sua vez, é dado pela contagem média dos fótons acrescido do valor do desvio padrão multiplicado por 1,5 ($\langle C \rangle +$

1,5 x dp). E o estado OFF é quando a intensidade de contagem é menor que este limite (*threshold*).

Aplicando esta regra convertemos a série temporal de contagens com flutuação em uma série binária **0 1** conforme apresentado nas figuras 47 e 48. O passo seguinte é a determinação da relaxação da frequência de tempo OFF (igual a **0**). Assim, na série binária completa devemos determinar a frequência com que são observadas as configurações **101**, **1001**, **10001**, **100001** e assim por diante. Fazendo isto para diferentes séries temporais de um mesmo experimento ou sistema (enzima/substrato), os valores ponderados da frequência OFF em função do tempo ou número de incrementos (por exemplo: 101 = 1 incremento; 1001 = 2 incrementos...).

Figura 50 – Frequência de tempo de relaxação OFF normalizada dos agregados do sistema Si-RN para os diferentes substratos adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. Concentração dos substratos da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹, em ciclo-hexano.

O resultado apresentado na figura 50 mostra que o decaimento é mais lento para os substratos que possuem cadeia mais curta DAQ (2 carbonos) e DBQ (4 carbonos) se comparados com os de cadeias maiores DHQ (6 carbonos) e DOQ (8 carbonos) quando a lipase está adsorvida nas nanopartículas de sílica (**Si-RN**).

No caso da lipase ligada à sílica (**Si-Prop-RN**), as curvas de relaxação OFF foram semelhantes para todos os substratos, figura 51, o que denota valores de tempo de decaimento OFF muito próximos.

Figura 51 – Frequência de tempo de relaxação de OFF normalizada dos agregados do sistema Si-Prop-RN para os diferentes substratos adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. Concentração dos substratos da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹, em ciclo-hexano.

Os tempos de decaimento para cada substrato nos dois sistemas estão representados na tabela abaixo.

Tabela 8 – Tempo da relaxação de tempo OFF normalizado dos agregados de nanopartículas de SiO₂ com a lipase adsorvida (Si-RN) e com lipase ligada (Si-Prop-RN).

	τ (10 ⁻² s) (Si-RN)	τ (10 ⁻² s) (Si-Prop-RN)
DAQ	13 ± 0,6	10 ± 0,4
DBQ	14 ± 0,6	12 ± 0,4
DHQ	6,2 ± 0,2	10 ± 0,2
DOQ	5,0 ± 0,2	14 ± 0,4

O menor tempo de relaxação OFF τ significa maior reatividade. Assim, $1/\tau$ é proporcional ou tem uma possível correlação qualitativa com a constante **k** da análise macroscópica.

A diferença entre os tempos de relaxação para o sistema **Si-RN** indica que os substratos de cadeia menor (DAQ e DBQ) têm menor reatividade para a lipase inserida nas partículas porosas de SiO₂. Este mesmo comportamento foi evidenciado com a lipase CALB em partículas de acrilato no estudo macroscópico (Tabela 3). Tanto a adsorvida no interior das nanopartículas, como as que estão na superfície. Já os substratos de cadeia maior (DHQ e DOQ), têm menos acesso à lipase que está no interior das nanopartículas de SiO₂. Com isso, o tempo de relaxação se torna menor, pois menos moléculas de substrato estão sendo convertidas num mesmo período de tempo. Para o sistema **Si-Prop-RN** todos os substratos têm acesso semelhante à lipase. Pois, neste caso a lipase está distribuída no exterior (superfície) das nanopartículas. Isso explica a similaridade no valor dos tempos de relaxação para todos os derivados.

As imagens e os gráficos de contagem de uma única nanopartícula de sílica ou de agregados bem pequenos após a adição do substrato de cadeia mais curta (DAQ) e de cadeia mais longa (DOQ) também foram medidos, figura 52. Estas medidas foram realizadas com o intuito de avaliar se a dinâmica (ou flutuações) promovida pela ação enzimática eram semelhantes as dos agregados maiores.

Figura 52 – Imagem de microscopia de fluorescência de um pequeno agregado de nanopartículas de sílica com a lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DAQ ($\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$) e seu correspondente gráfico de contagem.

O mesmo experimento foi feito com o derivado de cadeia maior (8 carbonos) DOQ. A imagem obtida e o gráfico de flutuação de contagem (corte) estão ilustrados na figura 53.

Figura 53 – Imagem de microscopia de fluorescência de um pequeno agregado de nanopartículas de sílica com a lipase adsorvida (Si-RN) após a adição do substrato DOQ ($\lambda_{\text{ex}} = 532\text{nm}$) e seu correspondente gráfico de contagem.

A frequência do tempo de relaxação OFF de um pequeno agregado com o sistema Si-RN mostrou o mesmo comportamento do que para os agregados maiores, figura 50.

Figura 54 – Frequência de tempo de relaxação de OFF normalizada dos agregados do sistema Si-RN para os diferentes substrato adicionados. As linhas (contínuas e tracejadas) são os ajustes do decaimento exponencial. A concentração dos substratos foi da ordem de 10^{-7} mol L^{-1} , em ciclo-hexano.

O tempo de decaimento da relaxação OFF obtido para os pequenos agregados foi muito similar com os obtidos anteriormente (agregados maiores). Para o substrato DAQ o tempo medido foi de $14 \pm 1,2$, enquanto que para o substrato DOQ foi de $5,8 \pm 0,4$ para o sistema Si-RN. Estes valores estão bem próximos dos reportados na tabela 1 ($13 \pm 0,6$ e $5,0 \pm 0,2$, respectivamente). Para todos os casos analisados, a relaxação OFF seguiu uma dinâmica exponencial que é esperada para um conjunto discreto de várias enzimas. Na situação limite de uma única enzima, a dinâmica não tem caráter exponencial, mas sim relaxa com $\tau^{-\alpha}$ [64-66].

4.6.3 – Tempo de vida obtido por microscopia de fluorescência confocal

Finalmente, medidas de transientes fluorescentes da quinizarina produzidos pela hidrólise enzimática também foram adquiridos usando excitação pulsada com 2-fótons, ($\lambda_{\text{ex}} = 800\text{nm}$). Inicialmente foi adquirida a imagem com 2-fótons e o decaimento foi obtido no

ponto central da região que apresentou emissão devido ao trabalho da lipase. Um exemplo destas medidas está representado na figura 55.

Figura 55 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal de um pequeno agregado de nanopartículas do sistema Si-RN após a adição do substrato DAQ (excitação com 2-fótons) e decaimento de fluorescência da quinizarina formada na reação de hidrólise. Excitação com 2-fótons, $\chi^2 = 1,025$.

O decaimento da quinizarina formada após a reação de hidrólise (trabalho enzimático) apresentou dinâmica biexponencial com um componente de tempo curto de 0,49ns e um longo de 2,17ns, para o sistema Si-RN. O tempo de vida da quinizarina pura em filme de polimérico (PVP) também foi medido com excitação de 2-fótons e apresentou uma dinâmica monoexponencial com tempo de vida de 2,23ns, figura 56.

Figura 56 – Decaimento de fluorescência da quinizarina em filme polimérico de PVP. Excitação com 2-fótons, $\chi^2 = 1,140$.

Em solução de ciclo-hexano, o tempo de vida da quinizarina é de 2,3ns [59, 60]. Portanto, o decaimento biexponencial e o tempo de vida curto encontrado no sistema Si-RN pode ser atribuído a uma fração da quinizarina ligada com a superfície da lipase distorcendo a simetria da ligação de hidrogênio intramolecular presente na quinizarina. O tempo de vida longo foi atribuído a quinizarina livre na fase solvente ou filme.

5 – CONCLUSÕES

A quinizarina e seus ésteres formam uma classe de fluoróforo/substrato próprio para estudos de hidrólise, em especial para lipases.

A reação de hidrólise dos diésteres simétricos de quinizarina segue uma cinética de dois processos sequenciais do tipo Michaelis-Menten. A hidrólise enzimática dos derivados DAQ, DBQ, DHQ e DOQ pela lipase suportada CALB (Novozyme® 435) tem como produto a quinizarina e pode ser estudada pela mudança na intensidade relativa de fluorescência com relação ao tempo de reação. Uma solução aproximada, em termos da constante cinética k , teve uma representação satisfatória do tempo de evolução da formação da quinizarina. Com isso, foi possível estimar o tempo médio de reação da hidrólise enzimática.

A lipase suportada (adsorvida ou ligada) em nanopartículas de sílica obtida pelo método de Stöber modificado forma um sistema de biocatalisadores imobilizados que tem boa reatividade frente à diésteres de quinizarina. O processo ou ação enzimática pode ser acompanhado por medida de microscopia de fluorescência confocal que monitora a formação do produto fluorescente quinizarina. A ação enzimática é praticamente independente da cadeia do diéster quando a lipase é ligada à superfície das partículas de sílica. Porém, quando a lipase está adsorvida os derivados com cadeia alquílica menor (DAQ e DBQ) têm mais acesso à lipase que está no interior da nanopartícula de SiO_2 do que os derivados de cadeia maior (DHQ e DOQ), que pode ser evidenciado pela diferença no tempo de relaxação. A análise por microscopia de fluorescência confocal permitiu observar a atividade enzimática usando concentrações muito baixas de substrato, menor que nanomolar (nanomoles / litro). Contudo, o método de preparação de adsorção ou ligação da enzima às nanopartículas de sílica não permite estabelecer um controle do número de enzima por partícula. Portanto, a cinética de uma partícula na hidrólise enzimática é o resultado de um número discreto mais elevado de enzimas ligadas à superfície.

6 – Perspectivas de trabalhos futuros

6.1 – Microscopia de fluorescência do fungo *Xylaria* sp

Além do estudo com enzimas, com a microscopia de fluorescência confocal também é possível fazer imagens de fungos. Em um breve experimento foram feitas medidas do fungo *Xylaria SP*, cedido gentilmente pelo professor André Luiz Meleiro Porto. Este fungo possui regiões em que há lipases presentes. O intuito do experimento foi detectar a região em que as lipases estavam presentes por meio da ação enzimática sobre os derivados da quinizarina por microscopia de fluorescência confocal. Porém, quando as medidas foram realizadas concluiu-se que o fungo *Xylaria SP* possui auto-fluorescência, o que impossibilita/mascara a detecção do sinal proveniente da quinizarina. As medidas foram feitas com fonte de excitação de 400nm e 532nm, utilizando 4mW e 10mW de potência, respectivamente. Algumas imagens deste experimento estão ilustradas a seguir.

Figura 57 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal do fungo *Xylaria* sp.

Em regiões mais concentradas de hifas é possível detectar com $\lambda = 400\text{nm}$ e, em regiões com poucas hifas (ou hifas mais finas) com $\lambda = 532\text{nm}$.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COMASSETO, J. V. A re-união da química e da biologia. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação**: fundamentos e aplicações. São Paulo: Editora Schoba, 2010. Cap. 1, p. 11-22.
- [2] AMANO ENZYME. **About enzymes**. Disponível em: <<http://www.amano-Enzyme.co.jp>>. Acesso em: 11 out. 2011.
- [3] SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, p. 1608-1633, 1998.
- [4] BORNSCHEUER, U. T.; KASLAUSKAS, R. J. **Hidrolases in organic synthesis**: regio- and stereoselective biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 355 p.
- [5] CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação**: fundamentos e aplicações. São Paulo: Editora Schoba, 2010. Cap. 8, p. 275-317.
- [6] HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2005.
- [7] VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- [8] AL-SUHAIR, S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1442-1448, 2005.
- [9] GAMBA, M.; LAPIS, A. A. M.; DUPONT, J. Supported ionic liquid enzymatic catalysis for the production of biodiesel. **Advances Synthesis Catalysis**, v. 350, p. 160-164, 2008.

[10] MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

[11] HACKLER, L. **Development of chemically modified glass surfaces and methods for microarray technologies**. 2004. 51f. PhD (Thesis) – Biological Research Center, Laboratory of Functional Genomics, Szeged, Hungary, 2004.

[12] SOARES, C. M. F. **Encapsulação da enzima lipase em matrizes sol-gel e sua aplicação em reações de hidrólise e esterificação**. 2004. 213f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

[13] STÖBER, W.; FINK, A. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. **Journal Colloid and Interface Science**, v. 26, p. 62, 1968.

[14] STRADNER, A.; MAYER, B.; SOTTMANN, T.; HERMETTER; GLATTER, O. Sugar surfactant-based solutions as host systems for enzyme activity measurements. **Journal Physical Chemistry B**, v. 103, p. 6680-6689, 1999.

[15] HINNER, M. J.; HÜBENER, G.; FROMHERZ, P. Enzyme-induced staining of biomembranes with voltage-sensitive fluorescent dyes. **Journal Physical Chemistry B**, v. 108, p. 2445-2453, 2004.

[16] HAUGLAND, R. P.; JOHNSON, I. D. Detecting enzymes in living cells using fluorogenic substrates. **Journal of Fluorescence**, v. 3, p. 119-127, 1993.

[17] GRUND, E.; ZANDONELLA, G.; PALTAUF, F.; HERMETTER, A. Conformational effects on the fluorescence of pyrene-labeled alkylglycerols in different model membranes. **Journal of Fluorescence**, v. 4, p. 365-366, 1994.

[18] DUQUE, M.; GRAUPNER, M.; STUTZ, H.; WICHER, I.; ZECHNER, R.; PALTAUF, F.; HERMETTER, A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. **Journal of Lipid Research**, v. 37, p. 868- 876, 1996.

[19] YANG, Y.; BABIAK, P.; REYMOND, J-L. New monofunctionalized fluorescein derivatives for the efficient high-throughput screening of lipases and esterases in aqueous media. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, p. 404-415, 2006.

[20] REYMOND, J-L. Modern biocatalysis – stereoselective and environmentally friendly reactions. In: FESSNER, W-D; ANTHONSEN, T. **Fluorescence assays for biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. Cap. 1.

[21] FLOMENBOM, O.; VELONIA, K.; LOSS, D.; MASUO, S.; COTLET, M.; ENGELBORGH, Y.; HOFKENS, J.; ROWAN, A. E.; NOLTE, R. J. M.; VAN DER AUWERAER, M.; DE SCHRYVER, F. C.; KLAFTER, J. Stretched exponential decay and correlations in the catalytic activity of fluctuating single lipase molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 2368-2372, 2005.

[22] OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVAR, H. E.; YARMOLUK, S. M.; YASHCHUK, V. M.; BERGEY, E. J.; PRASAD, P. N. A monomethine cyanine dye cyan 40 for two-photon-excited fluorescence detection of nucleic acids and their visualization in live cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, p. 138-145, 2003.

[23] BOTTIROLI, G.; CROCE, A. C.; BALZARINI, P.; LOCATELLI, D.; BAGLIONI, P.; LO NOSTRO, P.; MONICI AND, M.; PRATESI, R. Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for a efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, p. 374-383, 1997.

[24] REYMOND, J-L.; Substrate arrays for fluorescence-based enzyme fingerprinting and high-throughput screening. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1130, n. 1, p. 12-20, 2008.

[25] KENNEDY, J.; O'LEARY, N. D.; KIRAN, G. S.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A. D. W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 787-799, 2011.

[26] MANTOVANI, S. M.; OLIVEIRA, L. G.; MARSIOLI, A. J. Whole cell quick *E* for epoxide hydrolase screening using fluorescent probes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 173-177, 2008.

[27] CRUZ, G. F.; ANGOLINI, C. F. F.; OLIVEIRA, L. G.; LOPES, P. F.; VASCONCELLOS, S. P.; CRESPIM, E.; OLIVEIRA, V. M.; SANTOS NETO, E. V.; MARSOLI, A. J. Searching for monooxygenases and hydrolases in bacteria from an extreme environment. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 319-329, 2010.

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

[29] PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. Photoinduced Intramolecular Charge Transfer in 9-Aminoacridinium Derivatives Assisted by Intramolecular H-Bond. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n.24, p. 7539-7546, 2006.

[30] FAIN, V. Y.; ZAITSEV, B. E.; RYABOV, M. A. Electronic absorption spectra and tautomerism of quinizarin and its substituted derivatives. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 73, n. 10, p. 1595-1602, 2003.

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

[32] CHOUDHARY, V.; PATIL, K. Y.; JANA, S. K. Acylation of aromatic alcohols and phenols over InCl_3 /montmorillonite K-10 catalysts. **Journal Chemical Science**, v. 116, n. 3, p. 175-177, 2004.

[33] GÖRNER, H. Photoreactions of 1,4-naphthoquinones: effects of substituents and water on the intermediates and reactivity. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 376-383, 2005.

[34] BROWN, W. H. **Organic chemistry**. Fort Worth : Saunders, 1995. 1115 p.

[35] CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry: structure and mechanisms**. New York : Kluwer Academic, 2000. 1199 p.

[36] HUBBARD, P.; BRITAIN, W. J. Mechanism of amine-catalyzed ester formation from an acid chloride and an alcohol. **Journal Organic Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 677-683, 1998.

[37] OHEIMA, M.; MICHAEL, D. J.; GEISBAUER, M.; MADSEN, D.; CHOW, R. H. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 788–808, 2006.

[38] SHEPPARD, C. J. R. The generalized microscope. In: DIASPRO, A. **Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances**. New York: Wiley-Liss, 2002. Cap. 1, p. 1-17.

[39] JONKMAN, J. E. N.; STELZER, E. H. K. Resolution and contrast in confocal and two-photon microscopy. In: DIASPRO, A. **Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances**. New York: Wiley-Liss, 2002. Cap. 5, p. 101-125.

[40] WILSON, T. Confocal microscopy: basic principles and architectures. In: DIASPRO, A. **Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances**. New York: Wiley-Liss, 2002. Cap. 2, p. 19-38.

[41] DELPORT, F.; DERES, A.; HOTTA, J.; POLLET, J.; VERBRUGGEN, B.; SELS, B.; HOFKENS, J.; LAMMERTYN, J. Improved Method for Counting DNA Molecules on Biofunctionalized Nanoparticles. **Langmuir Letter**, v. 26, n. 3, p. 1594-1597, 2010.

[42] MOERNER, W. E.; FROMM, D. P. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 8, p. 3597-3619, 2003.

[43] WOLL, D.; BRAEKEN, E.; DERES, A.; DE SCHRYVER, F. C.; UJI-I, H.; HOFKENS, J. Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn? **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 313–328, 2009.

[44] DEDECKER, P.; HOFKENS, J. Caught in a trap. **Nature Chemistry**, v. 2, p. 157-158, 2010.

[45] VELONIA, K.; FLOMENBOM, O.; LOOS, D.; MASUO, S.; COTLET, M.; ENGELBORGH, Y.; HOFKENS, J.; ROWAN, A. E.; KLAFTER, J.; NOLTE, R. J. M.; DE SCHRYVER, F. C. Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 560–564, 2005.

- [46] ROEFAERS, M. B. J.; DE CREMER, G.; UJI-I, H.; SELS, B. F.; JACOBS, P. A.; DE SCHRYVER, F. C.; DE VOS, D. E.; HOFKENS, J. Single-molecule fluorescence spectroscopy in (bio)catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 31, p. 12603–12609, 2007.
- [47] HATZAKIS, N. S.; ENGELKAMP, H.; VELONIA, K.; HOFKENS, J.; CHRISTIANEN, P. C. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. A.; VIND, J.; MAAN, J. C. ROWAN, A. E.; NOLTE, R. J. M. Synthesis and single enzyme activity of a clicked lipase–BSA hetero-dimer. **Chemical Communication**, p. 2012–2014, 2006.
- [48] AMELOOT, R.; ROEFAERS, M.; BARUAH, M.; DE CREMER, G.; SELS, B.; DE VOS, D.; HOFKENS, J. Towards direct monitoring of discrete events in a catalytic cycle at the single molecule level. **Photochemical Photobiological Science**, v. 8, n.4, p. 453–456, 2009.
- [49] OLYMPUS. FluoView Resource Center. **Theory of Confocal Microscopy**: introduction to confocal microscopy. Disponível em: <<http://www.olympusfluoview.com>>. Acesso em: 08 abr. 2011.
- [50] MASSUCATTO, D. **Investigação cinética da lipase através de espectroscopia de fluorescência**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [51] MAHAJAN, A.; BEDI, R. K.; PRAMILA; KUMAR, S. Characterization of thermally evaporated 1,8-diacetoxy-9,10-anthraquinone films. **Thin Solid Films**, v. 398-399, p. 82-86, 2001.
- [52] FREDERICE, R. **Fluorescência molecular em nanopartículas de sílica marcadas com quercetina e rodamina B**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [53] LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Baltimore: Springer, 2006. Cap. 2, p. 54-55.
- [54] BERNEDE, J.C.; BEN NASRALLAH, T.; JAMALI, M.; MECELLE, J.Y.; RABILLER, C.; PROUTIERE, A. Is a hydrogen bond responsible for the optical properties of some dihydroxyanthraquinones: quinizarin and anthraflavic? **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 56, n. 9, p. 1239-1251, 1995.

[55] 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*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

[56] AMARASEKARA, A.S.; OWEREH, O.S. Synthesis of a sulfonic acid functionalized ionic liquid modified silica catalyst and applications in the hydrolysis of cellulose. **Catalysis Communications**, v. 11, p. 1072-1075, 2010.

[57] SCHNELL, S.; MENDOZA, C. J. Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. **Journal of Theoretical Biology**, v. 187, n. 2, p. 207, 1997.

[58] TZAFRIRI, A. R. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis–Menten constant. **Journal of Theoretical Biology**, v. 245, p. 737-748, 2007.

[59] PAL, H. D.; PALIT, D. K.; MUKHERJEE, T.; MITTAL, J. P. J. Interaction of the excited singlet state of disubstituted anthraquinones with aromatic hydrocarbons: a fluorescence-quenching study. **Chemical Physics Letters**, v. 173, p. 354-359, 1990.

[60] PALIT, D. K. ;PAL, H.; MUKHERJEE, T.; MITTAL, J. P. J. Photodynamics of the S1 state of some hydroxyl- and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. **Chemical Faraday Transactions**, v. 86, p. 3861-3869, 1990.

[61] KOHNO, M.; FUNATSU, J.; MIKAMI, B.; KUGIMIYA, W.; MATSUO, T.; MORITA, Y. The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å resolution. **Journal of Biochemistry**, v. 120, p. 505-510, 1996.

[62] KURIHARA, H.; NONAKA, T.; MITSU, Y. P.; OHG, K. F.; IRIE, M.; NAKAMURA, K. T. The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 255, p. 310-320, 1996.

[63] NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Nomenclature of enzymes by the reations they catalyse**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 11 out.2011.

[64] ROEFFAERS, M. B. J.; DE CREMER, G.; UJI-I, G. H.; MULS, B.; SELS, B. F.; JACOBS, P. A.; DE SCHRYVER, F. C.; DE VOS, D. E.; HOFKENS, J. Single-molecule fluorescence spectroscopy in (bio)catalysis. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 104, n. 31, p. 12603–12609, 2007.

[65] DE CREMER, G.; ROEFFAERS, M. B. J.; BARUAH, M.; SLIWA, M.; SELS, B. F.; HOFKENS, J.; DE VOS, D. E. Dynamic disorder and stepwise deactivation in a chymotrypsin catalyzed hydrolysis reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 15458–15459, 2007.

[66] MARTINEZ, V.; DE CREMER, G.; ROEFFAERS, M. B. J.; SLIWA, M.; BARUAH, M.; DE VOS, D. E.; HOFKENS, J.; SELS, B. F. Exploration of single molecule events in a haloperoxidase and its biomimic: localization of halogenation activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 13192–13193, 2008.

[67] FLOMENBOM, O.; VELONIA, K.; LOSS, D.; MASUO, S.; COTLET, M.; ENGELBORGHES, Y.; HOFKENS, J.; ROWAN, A. E.; NOLTE, R. J. M.; VAN DER AUWERAER, M.; DE SCHRYVER, F. C.; KLAFTER, J. Stretched exponential decay and correlations in the catalytic activity of fluctuating single lipase molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 2368–2372, 2005.

[68] DELPORT, F.; DERES, A.; HOTTA, J.; POLLET, J.; VERBRUGGEN, B.; SELS, B.; HOFKENS, J.; LAMMERTYN, J. Improved method for counting DNA molecules on biofunctionalized nanoparticles. **Langmuir Letter**, v. 26, n. 3, p. 1594–1597, 2010.

[69] MOERNER, W. E.; FROMM, D. P. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 8, p. 3597–3619, 2003.

[70] The Merck Index (An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals); 13 edition; Published by: Merck Research Laboratories; Merck and CO., INC., Whitehouse Station, NJ - 2001.

Apêndice 1

Considerando o mecanismo da reação enzimática abaixo foi desenvolvido um sistema de equações para descrevê-lo.

Figura A1: Mecanismo da reação enzimática com dois processos de Michaelis-Menten sequenciais.

$$\frac{d[\text{QzR}_2]}{dt} = k_{-2} [\text{EQzR}_2] - k_2 [\text{QzR}_2][E] \quad (\text{A1})$$

$$\frac{d[\text{QzR}]}{dt} = k_{-1} [\text{EQzR}] + K_{C2} [\text{EQzR}_2] - k_1 [\text{QzR}][E] \quad (\text{A2})$$

$$\frac{d[\text{Qz}]}{dt} = K_{C1} [\text{EQzR}] \quad (\text{A3})$$

$$\frac{d[\text{EQzR}_2]}{dt} = k_2 [\text{QzR}_2][E] - (k_{-2} + K_{C2}) [\text{EQzR}_2] \quad (\text{A4})$$

$$\frac{d[\text{EQzR}]}{dt} = k_1 [\text{QzR}][E] - (k_{-1} + K_{C1}) [\text{EQzR}] \quad (\text{A5})$$

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + K_{C1}) [\text{EQzR}] + (k_{-2} + K_{C2}) [\text{EQzR}_2] - (k_1 [\text{QzR}] + k_2 [\text{QzR}_2]) [E] \quad (\text{A6})$$

Considerando a condição do estado estacionário para os complexos intermediários $[\text{EQzR}_2]$ e $[\text{EQzR}]$ e, que a constante de Michaelis-Menten é dada por $K_M = \frac{k_{-n} + K_{Cn}}{k_n}$, temos que:

$$\frac{d[EQzR_2]}{dt} \approx 0 \quad (A7)$$

Ou seja,

$$k_2[QzR_2][E] - (k_{-2} + K_{C2})[EQzR_2] = 0 \quad (A8)$$

$$[EQzR_2] = \frac{k_2 [QzR_2][E]}{(k_{-2} + K_{C2})} \quad (A9)$$

$$[EQzR_2] = \frac{[QzR_2][E]}{K_{M2}} \quad (A10)$$

O mesmo vale para o intermediário [EQzR]:

$$[EQzR] = \frac{[QzR][E]}{K_{M1}} \quad (A11)$$

Substituindo K_{M1} e K_{M2} nas equações (A1) e (A2), temos que:

$$\frac{d[QzR_2]}{dt} = [E][QzR_2] \left(\frac{k_{-2}}{K_{M2}} - k_2 \right) \quad (A12)$$

$$\frac{d[QzR]}{dt} = k_{C2} \frac{[E][QzR_2]}{K_{M2}} + [QzR][E] \left(\frac{k_{-1}}{K_{M1}} - k_1 \right) \quad (A13)$$

$$\frac{d[Qz]}{dt} = K_{C1}[EQzR] = K_{C1} \frac{[QzR][E]}{K_{M1}} \quad (A14)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + K_{C1}) \frac{[QzR][E]}{K_{M1}} + (k_{-2} + K_{C2}) \frac{[QzR_2][E]}{K_{M2}} - (k_1[QzR] + k_2[QzR_2])[E] \quad (A15)$$

Simplificando as equações por α , β e γ . E considerarmos que $\frac{K_{C2}}{K_{M2}} = \frac{k_2 K_{C2}}{k_{-2} + K_{C2}} = \gamma$, temos que:

$$\frac{d[QzR]}{dt} = \gamma [QzR_2][E] + [QzR][E] \left(\frac{k_{-1}}{K_{M1}} - k_1 \right) \quad (A16)$$

E se $\left(\frac{k_{-1}}{K_{M1}} - k_1\right) = \beta$, podemos escrever que:

$$\frac{d[QzR]}{dt} = \gamma [QzR_2][E] + \beta [QzR][E] \quad (A17)$$

Aplicando a condição de estado estacionário na equação (A1):

$$\frac{d[QzR_2]}{dt} = [E][QzR_2] \left(\frac{k_{-2}}{K_{M2}} - k_2\right) \quad (A18)$$

E se $\left(\frac{k_{-2}}{K_{M2}} - k_2\right) = \alpha$, podemos reescrever a equação (A18) como:

$$\frac{d[QzR_2]}{dt} = [E][QzR_2]\alpha \quad (A19)$$

Integrando a equação (A19) temos:

$$QzR_2 = QzR_2^0 \exp(-\alpha E t) \quad (A20)$$

Esta equação (A20) considera que a concentração de enzima livre. Na qual, a condição de estado estacionário é dada por:

$$d[E] + d[EQzR] + d[EQzR_2] = 0 \quad (A21)$$

Além disso, esta equação é válida no regime de alta concentração de enzima se comparado com a concentração do substrato, na qual

$$[E]_{total} - [QzR] - [QzR_2] \gg K_{M1,2} \quad (A22)$$

Usando a condição de estado estacionário na equação (A2):

$$\frac{d[QzR]}{dt} = \alpha [QzR_2] - \beta [QzR] \quad (A23)$$

Os parâmetros α e β são definidos pelas equações:

$$\alpha = \frac{K_{C2}[E]}{K_{M2}} \quad e \quad \beta = \frac{K_{C1}[E]}{K_{M1}}$$

Assim a resolução para a equação (A23) nas condições iniciais, na qual $[QzR] = 0$ é:

$$[QzR](t) = \alpha [QzR_2](t) \otimes \exp[-\beta t] \quad (A24)$$

Na qual $\otimes$ é um operador de convolução. A solução da equação (A24) considerando a equação (A20) é:

$$[QzR](t) = \frac{\alpha [QzR_2^0]}{(\alpha - \beta)} (\exp[-\beta t] - \exp[-\alpha t]) \quad (A25)$$

Resolvendo a equação (A3) na condição de estado estacionário dada em (A10), temos a seguinte expressão para Qz:

$$[Qz](t) = \beta \int_0^1 [QzR](\tau) d\tau \quad (A26)$$

Usando a equação (A25) na (A26) e resolvendo a integral temos um caso especial onde $\alpha = \beta = k$ é uma derivada simples da equação (A24), e torna-se a expressão correspondente para QzR,

$$[QzR](t) = k [QzR_2^0] t \exp(-kt) \quad (A27)$$

Introduzindo a equação (A27) na equação (A26) e fazendo a integração resultamos em:

$$[Qz](t) = [QzR_2^0] (1 - (1 + kt) \exp(-kt)) \quad (A28)$$

Os resultados obtidos aqui são aproximações restritas e consideram que a competição pelo sítio ativo da enzima entre QzR_2 e QzR não é de caráter forte, devido a suas baixas concentrações. Desta forma, o sistema reacional pode ser reduzido a um mecanismo sequencial de primeira ordem com uma mesma constante k para a primeira e a segunda etapa.

O mecanismo de hidrólise com conversão direta do complexo $[EQzR_2]$ para $[EQzR]$, sem dissociação do intermediário $[EQzR]$ pode ser representado como:

Figura A2: Mecanismo de hidrólise com conversão direta do complexo $[EQzR_2]$ para $[EQzR]$.

Reescrevendo as equações cinéticas temos:

$$\frac{d[QzR_2]}{dt} = k_{-2} [EQzR_2] - k_2 [QzR_2][E] \quad (A29)$$

$$\frac{d[Qz]}{dt} = K_{C1} [EQzR] \quad (A30)$$

$$\frac{d[EQzR_2]}{dt} = k_2 [QzR_2][E] - (k_{-2} + K_f) [EQzR_2] \quad (A31)$$

$$\frac{d[EQzR]}{dt} = k_f [EQzR_2] - K_{C1} [EQzR] \quad (A32)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = K_{C1} [EQzR] + k_{-2} [EQzR_2] - k_2 [QzR_2][E] \quad (A33)$$

Aplicando a condição de estado estacionário em (A31 – A33):

$$\frac{d[EQzR_2]}{dt} \approx 0 \quad (A34)$$

$$[EQzR_2] = \frac{k_2 [QzR_2][E]}{k_{-2} + k_f} \quad (A35)$$

$$\frac{d[EQzR]}{dt} \approx 0 \quad (A36)$$

$$[EQzR] = \frac{k_f k_2 [QzR_2][E]}{(k_{-2} + k_f) K_{C1}} \quad (A37)$$

Introduzindo a equação (A35) na equação (A29) e integrando teremos o seguinte resultado:

$$[QzR_2](t) = QzR_2^0 \exp(-\mu t) \quad (A38)$$

na qual $\mu = \frac{k_f k_2 [E]}{k_{-2} + k_f}$ (A39)

Utilizando a equação (A35) e (A37) na equação (A30) e integrando teremos:

$$[Qz](t) = QzR_2^0 (1 - (1 + kt) \exp(-kt)) \quad (A40)$$

A fim de analisarmos os dados experimentais, assumimos que a intensidade de emissão de fluorescência $I(t)$ é proporcional a $[Qz](t)$. Desta forma, podemos reescrever a equação (A40) como:

$$I(t) = I_\infty (1 - (1 + kt) \exp(-kt)) \quad (A41)$$

Na qual I_∞ é a intensidade de fluorescência na saturação (longo limite de tempo) ou a máxima intensidade de emissão de fluorescência observada.