UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia das Fermentações

Regeneração de nucleotídeos β -nicotinamida adenínicos solúveis
ou imobilizados em sistemas com enzimas acopladas.

Diana Zukas Andreotti

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Michele Vitolo

São Paulo-SP
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andreotti, Diana Zukas
A559r Regeneração de nucleotídeos β -nicotinamida adenínicos
solúveis ou imobilizados em sistemas com enzimas acopladas /
Diana Zukas Andreotti. -- São Paulo, 2009.
135p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vitolo, Michele

1. Fermentação : Tecnologia de alimentos 2. Enzimologia
I. T. II. Vitolo, Michele, orientador.

664.02 CDD

Diana Zukas Andreotti

Regeneração de nucleotídeos β -nicotinamida adenínicos solúveis
ou imobilizados em sistemas com enzimas acopladas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Michele Vitolo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, Fevereiro de 2010.

*"Um pouco de ciência nos afasta
de Deus. Muito, nos
aproxima."
(Louis Pasteur)*

*"Se humilde para evitar o
orgulho, mas voa alto para
alcançar a sabedoria." (Santo
Agostinho)*

Dedico este trabalho a toda a minha família, especialmente a meus pais, meus alicerces, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades que Ele tem me oferecido ao longo de toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Michele Vitolo pela orientação, pela paciência, pela amizade e pelos ensinamentos e conselhos dispensados ao longo desses dois anos.

À Ester, também pela amizade e por sua disposição em ajudar sempre, mesmo estando longe. Sem ela grande parte desse trabalho não teria sido efetuada.

Aos meus pais, Valentim e Cristina e às minhas irmãs, Laura e Isadora, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao restante dos meus familiares pelo carinho e apoio.

A minha amiga e colega de laboratório Aline, pela ajuda e amizade.

Ao Fadi, meu namorado e colega de laboratório, pelo amor, pela cumplicidade e pelo incentivo, não somente no período do mestrado, mas durante os últimos 5 anos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, pela amizade e pela disposição em ajudar sempre.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu campus.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Enzimas e cofatores	1
1.2	Imobilização dos cofatores	6
1.3	Bioconversão	9
2.	Objetivos	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3.	Metodologia	13
3.1	Materiais	13
3.2	Equipamentos	13
3.3	Métodos	13
3.3.1	Técnicas Analíticas	13
3.3.1.1	Padronização dos reagentes de Somogyi	13
3.3.1.1.1	Preparação dos reagentes de Somogyi	13
3.3.1.1.2	Preparação da solução padrão de glicose	13
3.3.1.1.3	Estabelecimento da curva padrão	13
3.3.1.2	Determinação da proteína solúvel	14
3.3.1.3	Dosagem da amônia	15
3.3.1.4.	Determinação da concentração de NADP solúvel	15
3.3.1.5	Determinação da concentração de NAD solúvel	16
	Caracterização da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) quanto ao	
3.3.2	cofator NADP	16
3.3.2.1	Medida da atividade da G6PDH (NADP)	16
3.3.2.2	Efeito do pH na atividade da G6PDH (NADP)	17
3.3.2.3	Efeito da temperatura na atividade da G6PDH (NADP)	17
3.3.2.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH (NADP)	17
3.3.2.5	Estabilidade da G6PDH (NADP) frente ao pH	17
3.3.2.6	Estabilidade da G6PDH (NADP) frente a temperatura	17
3.3.2.7	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH (NADP)	18
	Caracterização da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) quanto ao	
3.3.3	cofator NAD	19
3.3.3.1	Medida da atividade da G6PDH (NAD)	19

3.3.3.2	Efeito do pH na atividade da G6PDH (NAD)	19
3.3.3.3	Efeito da temperatura na atividade da G6PDH (NAD)	19
3.3.3.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH (NAD)	19
3.3.3.5	Estabilidade da G6PDH (NAD) frente ao pH	20
3.3.3.6	Estabilidade da G6PDH (NAD) frente à temperatura	20
3.3.3.7	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH (NAD)	20
	Caracterização da Glutamato desidrogenase (GLUDH) quanto ao	
3.3.4	cofator NADPH	20
3.3.4.1	Medida da atividade da GLUDH (NADPH)	20
3.3.4.2	Efeito do pH na atividade da GLUDH (NADPH)	21
3.3.4.3	Efeito da temperatura na atividade da GLUDH (NADPH)	21
3.3.4.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade da GLUDH (NADPH)	21
3.3.4.5	Estabilidade da GLUDH (NADPH) frente ao pH	21
3.3.4.6	Estabilidade da GLUDH (NADPH) frente a temperatura	21
3.3.4.7	Determinação das constantes cinéticas da GLUDH (NADPH)	22
3.3.5	Caracterização da GLUDH quanto ao cofator NADH	22
3.3.5.1	Medida da atividade da GLUDH (NADH)	22
3.3.5.2	Efeito do pH na atividade da GLUDH (NADH)	22
3.3.5.3	Efeito da temperatura na atividade da GLUDH (NADH)	23
3.3.5.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade da GLUDH (NADH)	23
3.3.5.5	Estabilidade da GLUDH (NADH) frente ao pH	23
3.3.5.6	Estabilidade da GLUDH (NADH) frente à temperatura	23
3.3.5.7	Determinação das constantes cinéticas da GLUDH (NADH)	23
3.3.6	Imobilização de cofatores (NAD e NADP)	24
3.3.6.1	Preparação das amostras para a imobilização	24
3.3.6.2	Eficiência da imobilização	24
3.3.7	Regeneração do NADP/NAD na forma solúvel em regime descontínuo	24
3.3.7.1	Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH	24
3.3.7.2	Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala	25
3.3.8	Regeneração do NAD/NADH na forma solúvel em regime descontínuo	25
3.3.8.1	Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala	25
	Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala e	26
3.3.8.2	com o NAD imobilizado	

	Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma solúvel em regime descontínuo	26
3.3.9		
	Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma imobilizada em regime contínuo.	26
3.3.10		
4.	Resultados e discussão	
	Caracterização da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) quanto ao	
4.1	cofator NAD	26
4.1.1	Padronização da atividade enzimática	26
4.1.2	Efeito do pH na atividade da enzima	27
4.1.3	Efeito da temperatura na atividade enzimática	28
4.1.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH	28
4.1.5	Estabilidade da G6PDH frente ao pH	30
4.1.6	Estabilidade da G6PDH frente à temperatura	31
4.1.7	Determinação das constantes cinéticas	34
	Caracterização da Glicose-6-fosfato desidrogenase quanto ao cofator	
4.2	NAD	37
4.2.1	Padronização da atividade enzimática	37
4.2.2	Efeito do pH na atividade enzimática	37
4.2.3	Efeito da temperatura na atividade enzimática	38
4.2.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	39
4.2.5	Estabilidade da G6PDH frente ao pH	41
4.2.6	Estabilidade da G6PDH frente à temperatura	42
4.2.7	Determinação das constantes cinéticas	43
	Caracterização da Glutamato desidrogenase (GLUDH) quanto ao	
4.3	cofator NADPH	46
4.3.1	Padronização da atividade enzimática	46
4.3.2	Efeito do pH na atividade da enzima	47
4.3.3	Efeito da temperatura na atividade enzimática	47
4.3.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	48
4.3.5	Estabilidade da GLUDH frente ao pH	49

4.3.6	Estabilidade da GLUDH frente à temperatura	50
	Determinação das constantes cinéticas para a GLUDH com relação ao	
4.3.7	NADPH	51
	Caracterização da Glutamato desidrogenase (GLUDH) quanto ao	
4.4	cofator NADH	53
4.4.1	Padronização da atividade enzimática	53
4.4.2	Efeito do pH na atividade da GLUDH	54
4.4.3	Efeito da temperatura na atividade da GLUDH	54
4.4.4	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	55
4.4.5	Estabilidade da GLUDH frente ao pH	57
4.4.6	Estabilidade da GLUDH frente à temperatura	58
4.4.7	Determinação das constantes cinéticas com relação ao NADH	59
4.5	Imobilização de cofatores (NAD e NADP)	59
4.6	Regeneração do NADP/NAD na forma solúvel em regime descontínuo	60
	Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma imobilizada	67
4.7	em regime descontínuo.	
	Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma solúvel em	
	regime contínuo.	69
	Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma imobilizada	
4.9	em regime contínuo	
5.	Conclusões	76
6.	Referências Bibliográficas	77
ANEXO I	Formulação de reagentes e Tabelas	81
ANEXO II	Resumos submetidos a eventos	91

Índice de Tabelas.

Tabela 1	Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.	14
Tabela 2	Sistema montado para o estabelecimento da curva-padrão para a determinação de proteína solúvel.	14
Tabela 3	Sistema montado para o estabelecimento da curva-padrão para a dosagem de amônia	15
Tabela 4	Sistema montado para a determinação da concentração de NADP e NAD solúvel.	16
Tabela 5	Volume e concentração de NADP utilizado na determinação de K_m e $V_{máx}$.	18
Tabela 6	Volume e concentração de G6P utilizado na determinação de K_m e $V_{máx}$.	19
Tabela 7	Volume e concentração de NADPH utilizado na determinação de K_m e $V_{máx}$.	22
Tabela 8	Volumes dos reagentes para o sistema de reação acoplada	25
Tabela 9	Atividade da G6PDH em relação ao pH e à temperatura, usando a coenzima NADP.	29
Tabela 10	Atividade da G6PDH em função do tempo (intervalos: zero a 1,5h) a duas temperaturas.	32
Tabela 11	Valores das constantes de desnaturação térmica para $T = 40^\circ\text{C}$ e $T = 45^\circ\text{C}$, da energia de ativação da desnaturação térmica, da entalpia de desnaturação térmica e as correspondentes meias-vidas.	33
Tabela 12	Atividade da G6PDH, em presença de NAD, de acordo com a temperatura.	39
Tabela 13	Atividade da G6PDH em relação ao pH e à temperatura	40
Tabela 14	Atividade da GLUDH em função da variação de temperatura	48

Tabela 15	Atividade da GLUDH em relação ao pH e à temperatura	49
Tabela 16	Determinação das constantes cinéticas da GLUDH frente ao NADPH	53
Tabela 17	Atividade segundo a variação de temperatura	55
Tabela 18	Atividade da GLUDH em relação ao pH e à temperatura, usando o NADH como cofator	56
Tabela 19	Eficiência da imobilização de cofatores (NADP e NAD), expressa em porcentagem, por resinas de troca iônica em diferentes pHs.	59
Tabela 20	Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 1mL. O meio reacional foi composto por 290µL de tampão tris (0,05M), 500µL de G6P (50mM), 40µL de NADP (500µM), 100µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 70 µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	60
Tabela 21	Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NADP (500µM), 1000µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 700 µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	61
Tabela 22	Tabela 22: Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 40°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NADP (500µM), 1000µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	63
Tabela 23	Variação das concentrações de G6P, amônia e NAD ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As	64

condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NAD (500µM), 1000µL de NH₄⁺ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Tabela 24	Variação das concentrações de G6P, amônia e NAD ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 40°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NAD (500µM), 1000µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	65
Tabela 25	Variação das concentrações de G6P e amônia ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), NADP imobilizado, 1000µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	68
Tabela 26	Variação das concentrações de G6P e amônia ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), NAD imobilizado, 1000µL de NH ₄ ⁺ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).	68
Tabela 27	Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 53.	70
Tabela 28	Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 54.	71
Tabela 29	Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig.55	72
Tabela 30	Média da conversão dos substratos em 30h de reação cujos perfis de variação são apresentados na Fig.56.	73

Tabela 31	Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 57.	74
Tabela 32	Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 58.	75

Índice de figuras.

Figura 1	Esquema reacional do sistema bienzimático preconizado neste trabalho.	4
Figura 2	Formação de NADPH em função do tempo, resultante da oxidação da G6P pela G6PDH em presença de NADP. A reação foi executada em cubeta de 1cm em $\lambda=340\text{nm}$ a 30°C e pH 7,5. A reta de regressão linear é: $y = 0,0368t + 1,781$ ($r = 0,998$).	27
Figura 3	Variação da atividade da G6PDH em diferentes valores de pH, usando o NADP como cofator.	27
Figura 4	Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas, usando o NADP como cofator.	28
Figura 5	Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas [$(^{\circ})30^{\circ}\text{C}$, $(^{\text{TM}})35^{\circ}\text{C}$, $(\phi)40^{\circ}\text{C}$ e $(\text{£})45^{\circ}\text{C}$] combinadas com diferentes valores de pH.	29
Figura 6	Estabilidade da G6PDH submetida a diferentes temperaturas [$(^{\circ})30^{\circ}\text{C}$, $(^{\text{TM}})35^{\circ}\text{C}$, $(\phi)40^{\circ}\text{C}$ e $(\text{£})45^{\circ}\text{C}$] por um período de 2h, em pH 7,5.	30
Figura 7	Estabilidade da G6PDH submetida a diferentes temperaturas [$(\square)30^{\circ}\text{C}$, $(\square)35^{\circ}\text{C}$, $(\phi)40^{\circ}\text{C}$ e $(\text{£})45^{\circ}\text{C}$] por um período de 30h, em pH 7,5.	30
Figura 8	Logaritmo da atividade da G6PDH em função do tempo para as temperaturas de 40° ($\circ$) e 45°C ($\bullet$). As equações das retas são: $\text{Log } v_{40} = -0,059t - 1,452$ ($r = 0,991$) e $\text{Log } v_{45} = -0,8t - 1,406$ ($r = 0,998$).	31
Figura 9	Estabilidade da G6PDH frente aos valores de pH [$(^{\circ})7,0$; $(^{\text{TM}})7,5$; $(\phi)8,0$ e $(\text{£})\text{pH } 8,5$], por um período de 2h a 30°C .	31
Figura 10	Estabilidade da G6PDH frente aos valores de pH [$(^{\circ})7,0$; $(^{\text{TM}})7,5$; $(\phi)8,0$ e $(\text{£})\text{pH } 8,5$], por um período de 30h a 30°C .	33
Figura 11	Atividade da G6PDH nas diferentes concentrações de NADP.	34
Figura 12	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta: $1/v = 139,44(1/s)$	35

+ 90,95 ($r = 0,992$).

Figura 13	Atividade G6PDH nas diferentes concentrações de G6P.	35
Figura 14	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta $1/v = 182,41(1/s) + 7,03$ ($r = 0,9994$).	36
Figura 15	Formação de NADH em função do tempo, resultante da oxidação da G6P pela G6PDH em presença de NAD. A reação foi executada em cubeta de 1 cm de caminho óptico em $\lambda = 340\text{nm}$ a 30°C e pH 7,5. A reta de regressão linear é: $y = 0,0199t + 0,07103$; $r = 0,994$.	37
Figura 16	Variação da atividade da G6PDH em diferentes pHs, usando NAD como cofator	38
Figura 17	Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas, usando o NAD como cofator.	38
Figura 18	Variação da atividade da G6PDH, na presença do NAD, em diferentes temperaturas [$(^\circ)$ 30°C , $(^{\text{TM}})$ 35°C , (ϕ) 40°C e (£) 45°C] combinadas com diferentes valores de pH.	40
Figura 19	Estabilidade da G6PDH submetida às temperaturas de $(^\circ)$ 30°C e (£) 45°C por um período de 2h em pH 7,5.	41
Figura 20	Estabilidade da G6PDH submetida às temperaturas de $(^\circ)$ 30°C e (£) 45°C por um período de 30h em pH 7,5.	41
Figura 21	Estabilidade da G6PDH frente ao pH [$(^\circ)$ 7,0; $(^{\text{TM}})$ 7,5; (ϕ) 8,0 e (£) 8,5] por um período de 2h a 30°C .	42
Figura 22	Estabilidade da G6PDH frente ao pH [$(^\circ)$ 7,0; $(^{\text{TM}})$ 7,5; (ϕ) 8,0 e (£) 8,5] por um período de 30h a 30°C .	42
Figura 23	Atividade da G6PDH nas diferentes concentrações de NAD.	43
Figura 24	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH empregando o método de Lineweaver – Burk, sendo a equação da reta: $y = 30,92(1/s) + 2,56$ ($r = 0,995$).	43

Figura 25	Atividade da G6PDH nas diferentes concentrações de G6P.	44
Figura 26	Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta $1/v = 391,7(1/s) + 7,58$ ($r = 0,992$).	45
Figura 27	Consumo de NADPH em função do tempo resultante da redução de 2-oxoglutarato pela glutamato desidrogenase (GLUDH). A reta de regressão linear é: $y = -0,0245t + 135,85$; ($r = 0,997$), onde y corresponde à concentração de NADPH consumido.	46
Figura 28	Variação da atividade da GLUDH em diferentes pHs, usando o NADPH como cofator.	47
Figura 29	Variação da atividade da GLUDH em diferentes temperaturas, usando o NADPH como cofator.	47
Figura 30	Variação da atividade da GLUDH, na presença de NADPH, em diferentes temperaturas combinadas com diferentes pHs: (°)30°C, (™)35°C, (¢)40°C e (£)45°C.	48
Figura 31	Estabilidade da GLUDH submetida às temperaturas de (°)30°C, (™)35°C, (¢)40°C e (£)45°C por um período de 2h, em pH 7,5.	49
Figura 32	Estabilidade da GLUDH submetida às temperaturas de (°)30°C, (™)35°C, (¢)40°C e (£)45°C por um período de 30h, em pH 7,5.	50
Figura 33	Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(°)7,0; (™)7,5; (¢)8,0 e (£)8,5] por um período de 2h a 30°C.	50
Figura 34	Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(°)7,0; (™)7,5; (¢)8,0 e (£)8,5] por um período de 30h a 30°C.	51
Figura 35	Atividade da GLUDH nas diferentes concentrações de NADPH	52
Figura 36	Determinação das constantes cinéticas da GLUDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta: $1/v = 0,268(1/s) + 5,2$ ($r = 0,997$).	52

Figura 37	Consumo de NADH em função do tempo, resultante da redução do 2-oxoglutarato pela GLUDH. A reta de regressão linear é: $y = -0,0336t + 152,59$ ($r = 0,995$), onde y corresponde à concentrações de NADH, ainda, na forma reduzida.	53
Figura 38	Variação da atividade da GLUDH em diferentes pHs, usando NADH como cofator.	54
Figura 39	Variação da atividade da GLUDH em diferentes temperaturas.	55
Figura 40	Variação da atividade da GLUDH na presença de NADH em diferentes temperaturas [($^{\circ}$)30°C, (TM) 35°C, (ϕ) 40°C e ($\pounds$) 45°C] combinadas com diferentes valores de pH.	56
Figura 41	Estabilidade da GLUDH frente às temperaturas ($^{\circ}$)30°C, (TM) 35°C, (ϕ) 40°C e ($\pounds$) 45°C por um período de 2h, em pH 7,5.	57
Figura 42	Estabilidade da GLUDH frente às temperaturas ($^{\circ}$)30°C, (TM) 35°C, (ϕ) 40°C e ($\pounds$) 45°C por um período de 30h, em pH 7,5.	57
Figura 43	Estabilidade da GLUDH frente ao pH [($^{\circ}$)7,0; (TM)7,5; (ϕ)8,0 e ($\pounds$)8,5] por um período de 2h a 30°C	58
Figura 44	Estabilidade da GLUDH frente ao pH [($^{\circ}$)7,0; (TM)7,5; (ϕ)8,0 e ($\pounds$)8,5] por um período de 30h a 30°C.	58
Figura 45	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia ($\grave{u}$) e G6P ($<$)).	61
Figura 46	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia ($\grave{u}$) e G6P ($<$)).	62
Figura 47	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 40°C e pH 7,3 (Amônia ($\grave{u}$) e G6P ($<$)).	63
Figura 48	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da	65

	GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	
Figura 49	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 40°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	66
Figura 50	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), a 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	67
Figura 51	Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD), a 40°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	67
Figura 52	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), com fluxo de alimentação de 10mL/h, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	69
Figura 53	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos com fluxo de 10mL/h, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	70
Figura 54	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos com fluxo de 10mL/h, a 40°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	71
Figura 55	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	72
Figura 56	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	73

Figura 57	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP imobilizado), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	74
Figura 58	Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD imobilizado), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (ù) e G6P (<)).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	micromolar
K_m	constante de Michaelis-Menten
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
μmol	micromol
min	minuto
mL	mililitros
K_{eq}	constante de equilíbrio
MM	massa molar
nm	nanômetros
g	gramas
mM	milimolar
M	molar
cm	centímetros
μL	microlitros
K	graus Kelvin
C	graus Celsius
E_a	Energia de ativação
h	hora
T	Temperatura
s	segundo
kDa	quiloDaltons
r	coeficiente de correlação referente a regressão linear
[NADH]	concentração do cofator
v_{G6PDH}	atividade enzimática
kJ	quiloJoule
ΔH	variação de entalpia
K_d	constante de desnaturação enzimática
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida
CV	coeficiente de variação
S	substrato
DP	desvio padrão
[G6P] _{inicial}	quantidade de substrato inicial
[NH ₄ ⁺] _{final}	quantidade de substrato residual ao término da reação

Regeneração de nucleotídeos β -nicotinamida adenínicos solúveis ou imobilizados em sistemas com enzimas acopladas.

Diana Zukas Andreotti

Resumo

As bioconversões executadas com enzimas, que requerem NADP ou NADPH, são limitadas pela eficiência com que esta substância é mantida na forma particular requerida pelo catalisador ao longo de toda a reação, assim como pela sua recuperação no final do processo. Neste trabalho, foram caracterizadas as enzimas Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e Glutamato desidrogenase (GLUDH), além do estudo do reciclo NADP/NADPH em sistema constituído por essas enzimas. Determinou-se a temperatura (30°C) e pH ótimo da G6PDH (pH 7,5), assim como a temperatura (40°C) e o pH ótimo (pH 8,0) da GLUDH, além dos volumes e concentrações dos substratos utilizados na hidrólise enzimática. No caso da reação acoplada descontínua, a duração foi de 90min, às temperaturas de 30°C e 40°C, utilizando-se o cofator solúvel ou imobilizado. Em ambas as condições, mais de 85% das concentrações iniciais de G6P e NH_4^+ , respectivamente, substratos da G6PDH e GLUDH, foram convertidas, sendo o reciclo NADP/NADPH mantido durante toda a reação. No caso da reação bienzimática em reator contínuo, não foi possível chegar ao estado estacionário da reação e a conversão dos substratos G6P e NH_4^+ variaram de acordo com o período do teste.

Regeneration of nucleotides β -nicotinamide adenine soluble or immobilized enzyme coupled systems.

Diana Zukas Andreotti

ABSTRACT

The Bioconversion performed with enzymes that require NADPH or NADP are limited by the efficiency with which this substance is maintained in the particular form required by the enzyme throughout the reaction, as well as for his recovery at the end of the process. The main aim of this work was to study the NADP/NADPH recycling through a bienzyme coupled reaction constituted by glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutamate dehydrogenase (GLUDH). The reaction was carried out in the discontinuous or continuous mode. The discontinuous process, which was carried out with soluble or immobilized NADP at 30oC or 40oC, had a total duration of 90min. Independently on the temperature used, around 85% of the initial concentration of glucose 6-phosphate (G6P) and ammonia were consumed, being the recycle of NADP/NADPH maintained throughout the reaction. In the continuous process, the addition of G6P and ammonia into the membrane reactor was made by turns of 2h. During the 15h-process the NADP/NADPH recycling was attained and the mean consumption yield of ammonia and G6P neared 30% and 60%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas e Cofatores

As enzimas são proteínas com propriedades catalisadoras, sobretudo em reações químicas de sistemas biológicos. Podem ser classificadas em oxidorreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

As oxidorreduases representam cerca de um quarto de todas as enzimas conhecidas. Estas possuem um amplo espectro de ação, como síntese de compostos quirais, modificações de polímeros e degradação de poluentes orgânicos (KULA e KRAGL, 2000), síntese de produtos farmacêuticos e aditivos para a indústria de alimentos (KIM e YOO, 2009), estando relacionada com a catálise de reações de oxidorredução em sistemas biológicos, além de processos de respiração e fermentação, geração de combustíveis (KIM e YOO, 2009) e produção de álcoois secundários opticamente ativos (MANTRI e JAMBHRUNKAR, 2009). Estão incluídas nessa classe as desidrogenases (DHs), oxidases, peroxidases (que usam o peróxido de hidrogênio como agente oxidante), hidroxilases (introduzem hidroxilas em moléculas insaturadas) e as oxigenases (que oxidam o substrato a partir da molécula de O_2) (KIELING e FURIGO JÚNIOR, 2002). Grosso modo, as oxidorreduases podem ser subdivididas em dois grandes grupos, a saber, aquelas que possuem o cofator ligado covalentemente à molécula (por ex., glicoseoxidase e peroxidase) e aquelas em que o cofator, a princípio livre em solução, deve se ligar transitoriamente à molécula para que a catálise se concretize (por ex., glicose 6-fosfatodesidrogenase, glutamato desidrogenase, manitol desidrogenase) (ROCHA FILHO e VITOLO, 1998), através da transferência de prótons para as coenzimas (MANTRI e JAMBHRUNKAR, 2009). Em ambos os casos o cofator deve ser regenerado “in situ”. No caso das enzimas em que o cofator é um grupo prostético, sua regeneração se dá através da participação de um substrato auxiliar (oxigênio no caso da glicoseoxidase, por exemplo), ao passo que para aquelas em que o cofator é solúvel – coenzima – sua regeneração, geralmente, é catalisada por uma reação enzimática acoplada, para a qual o cofator oxidado ou reduzido atua como co-substrato.

A aplicação industrial das oxidorreduases tem se restringido àquelas que possuem o grupo redox em suas moléculas e, dentre estas, as de maior uso são a glicoseoxidase e a peroxidase (GODFREY e WEST, 1996), apesar das desidrogenases dependentes de cofatores serem muito úteis na síntese de produtos de química fina (HUMMEL e KULA, 1989). A glicoseoxidase – sem dúvida a mais usada dentre as

oxidorreduções – é utilizada na remoção da glicose em matérias-primas alimentícias nas quais se deseja evitar a reação de Maillard (por ex., na desglicosação de ovos para uso na fabricação de massas para macarrão com ovos), além de ser uma alternativa às vias química e fermentativa na produção do ácido glicônico a partir da oxidação da glicose (NAGODAWITHANA e REED, 1993; TOMOTANI et al., 2005).

No entanto, as oxidorreduções que requerem coenzimas não têm sido usadas em escala industrial, embora venham sendo muito empregadas em métodos analíticos (GODFREY e WEST, 1996). A razão principal disto é a dificuldade de se regenerar com eficiência o cofator, que deve ser total segundo OBÓN et al (1996), uma vez que seu custo, em geral, é superior ao da enzima. (LIU et al, 2009).

Ao lado dos cofatores iônicos ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mg^{2+} , etc.) – normalmente integrantes da estrutura da enzima – tem-se aqueles que estão solubilizados no meio reacional e que se ligam à enzima somente durante a catálise, sendo incluídos neste grupo, por exemplo, o FAD/FADH₂, NAD/NADH e NADP/NADPH. Estes três pares de cofatores têm em comum em suas moléculas o grupo adenina-dinucleotídeo, diferindo, apenas, no grupo oxi-red, que no FAD/FADH₂ é a flavina e nos outros a nicotinamida. As oxidorreduções de maior interesse aplicativo são as que requerem cofatores β -nicotinamida-adenínicos (LIU e WANG, 2007).

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD na sua forma oxidada) e o seu análogo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), se diferenciam pela presença de um grupo fosfato no lugar de uma hidroxila no carbono dois da ribose, são compostos de dois nucleotídeos unidos através dos seus grupos fosfatos por uma ligação de anidrido de ácido fosfórico. Ambas as coenzimas sofrem redução reversível do anel nicotinamida (LIU e WANG, 2007).

Quando uma molécula sofre oxidação, liberando dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD ou NADP) recebe um hidreto e é transformada na sua forma reduzida (NADH ou NADPH). O segundo H^+ removido da molécula é liberado para o solvente aquoso. A principal função do NAD é captar os elétrons resultantes da oxidação de um substrato, assim o NAD sofre redução, passando para NADH, o qual conserva a energia livre liberada pela oxidação deste substrato. Isto reflete os papéis metabólicos especializados dos dois cofatores: O NAD geralmente funciona nas oxidações catabólicas, e o NADH é o cofator usual das reduções anabólicas (LIU e WANG, 2007).

Os cofatores β -nicotinamida-adenínicos são encontrados em todas as células vivas em distribuições variadas no citossol e região de mitocôndrias. No sangue, por exemplo, estão em elementos como eritrócitos, trombócitos e leucócitos (BERGMEYER, 1984). São compostos vitais para o organismo, porque são os cofatores da maioria das enzimas oxidativas intracelulares. Lembra-se, também, que na maioria das vias metabólicas, pelo menos uma etapa é de caráter óxido-redutivo (GARRET e GRIMSON, 1995). Estes compostos possuem dois (NAD/NADH) ou três (NADP/NADPH) hidrogênio ácidos - aqueles ligados aos átomos de fósforo através de hidroxilas - tornando possível sua adsorção em resinas aniônicas e com isto ter-se a possibilidade de reciclá-los após ou durante a reação, fazendo com que o seu alto custo seja amortizado pela reutilização e/ou uso em processo contínuo.

Em todo o caso, quer o cofator esteja na forma solúvel quer na insolúvel (adsorvido em resina trocadora de íons, por exemplo) ele precisa ser continuamente regenerado para que a reação de óxido-redução não pare. Para a escolha de um sistema de regeneração adequado, deve-se levar em consideração se a reação é termodinamicamente favorável e se o substrato ou subproduto não interfere no método escolhido (HUMMEL e KULA, 1989). Existem muitos métodos para a regeneração desses cofatores, como o químico, eletroquímico e fotoquímico. No caso do método eletroquímico, devem ser consideradas algumas desvantagens, a saber, a toxicidade de alguns mediadores para as enzimas, resultando na sua desnaturação, o prejuízo no desempenho e na estabilidade durante a reação (KIM e YOO, 2009) e a dificuldade em prosseguir a reação em caso de um aumento de escala (HUMMEL e KULA, 1989). Para tanto, o uso acoplado de enzimas – onde uma provoca a redução e a outra a oxidação do cofator – é considerado um importante meio de se alcançar este objetivo.

Neste projeto, selecionou-se o sistema bienzimático glicose-6-fosfato desidrogenase [NADP (NAD) $\rightleftharpoons$ NADPH (NADH)] / glutamato desidrogenase [NADPH (NADH) $\rightleftharpoons$ NADP (NAD)] - (Figura 1) - para estudar a regeneração do cofator solúvel ou insolúvel usando os processos descontínuo e contínuo (neste caso, o uso de reator com membrana).

Figura 1. Esquema reacional do sistema bienzimático preconizado neste trabalho.

A regeneração de NADP para NADPH é relativamente simples, porém a regeneração reversa tem algumas dificuldades, a saber, a maioria das oxidações enzimáticas não são termodinamicamente favoráveis ou são inibidas pelos produtos e a maioria dos biocatalizadores são instáveis quando submetidos ao seu pH de maior atividade (LEE e WHITESIDES, 1985).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma enzima presente em todos os tecidos humanos e animais. Além disso, pode ser obtida de várias fontes microbianas, sendo o *Saccharomyces cerevisiae* a mais importante (MIGUEL et al., 2007). A enzima é estável na faixa de pH entre 3 e 10 e de temperatura entre 25° C e 45° C, sendo a atividade ótima obtida em pH 7,4 a 30° C. As constantes cinéticas K_M e V_{max} são, respectivamente, iguais a 49,1 μM e 3,37 μmol NADP/min.mL (RIBEIRO, 2001). Apesar do NADP (NAD) ser o cofator para a ação da G6PDH, alguns íons (Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+}) podem atuar como ativadores. Em contrapartida existem diversos inibidores (Zn^{2+} , Hg^{2+} , glioxilato, acetil-CoA, dentre outros) que desativam a G6PDH, mas que certamente não estarão presentes no meio reacional proposto.

A G6PDH está envolvida diretamente na produção de NADPH durante a via da hexosemonofosfato, na medida em que catalisa a primeira reação dessa via transformando a glicose-6-fosfato em 6-fosfoglucono- δ -lactona. O NADPH obtido atua na glutathiona fazendo com que permaneça no seu estado reduzido, forma ideal para desempenhar seu papel na proteção da célula contra agentes oxidantes. A deficiência de G6PDH mais freqüente é a eritroenzimopatia, consequência de mutações pontuais no gene que se encontra no braço longo do cromossomo X. As manifestações clínicas mais comuns são a hemólise induzida por fármacos e a icterícia neonatal (SILVA et al, 2006). Esta é a mais freqüente enzimopatia em seres humanos, presente em mais de 400

milhões de pessoa em todo o mundo (MASON ET AL, 2007). A G6PDH hepática vem sendo estudada como modelo adaptativo de regulação de dietas e hormônios, isso porque ela é incluída na classe das enzimas lipogênicas, que inclui o acetil CoA. As enzimas lipogênicas são ativadas no fígado somente em caso de excesso de carboidratos, agindo na síntese de ácidos graxos, sendo esse processo regulado pela insulina. A glicose 6-fosfatodesidrogenase pode ainda ser encontrada em tecidos adiposos e no útero, onde sua produção é estimulada pelo estrógeno. Além disso, atua na regulação do sistema endócrino. Em vegetais superiores, a G6PDH está presente no citosol e nos plastídios. Participa do ciclo de Calvin, sendo ativada na presença de luz pelo sistema da ferridoxina.

Esta enzima é utilizada como marcador em imunoenaios enzimáticos e como reagente em outros ensaios enzimáticos, como na determinação da atividade da hexoquinase e creatino quinase, ATP e concentração de hexoses e a concentração de açúcares ilegalmente adicionados em vinhos e sucos de frutas (RIBEIRO, et al, 2007).

A estrutura de G6PDH humana é muito similar a G6PDH da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, utilizada nesse trabalho. Em ambas, a enzima é um dímero, sendo que cada subunidade possui um sítio ativo, sendo os monômeros compostos por dois domínios, a saber: um para a coenzima e outro para a ligação com o outro monômero para a formação da estrutura característica da molécula. A molécula humana possui a coenzima NADP na estrutura de cada subunidade. Outra diferença entre as duas formas da enzima é o aminoácido prolina 172, cuja conformação é trans na molécula humana e cis na molécula bacteriana (MASON et al, 2007).

A glutamato desidrogenase (GLUDH) é encontrada em todos os organismos vivos e catalisa a desaminação do L-glutamato em 2-oxoglutarato, pela reação direta, utilizando o NADP como coenzima (SMITH e STANLEY, 2008). Na produção de glutamato e amônio do melaço, através da *corynebacterium glutamicum*, a GLUDH é a enzima chave para a conversão de 2-oxoglutarato em L-glutamato, através da reação inversa, utilizando-se o cofator NADPH (HUMMEL e KULA, 1989). De um modo geral, o pH e a temperatura de atividade ótima para a GLUDH obtida das várias fontes encontram-se dentro dos intervalos 6,7-8,5 e 25-60°C, respectivamente. A GLUDH catalisa a formação do L-glutamato a partir do 2-oxoglutarato, NADPH (NADH) e amônia a 30° C e pH 8,3. TOMOTANI (2007) determinou para a GLUDH de *Cândida utilis* as constantes cinéticas frente a cada um dos substratos da GLUDH, a saber, oxoglutarato [$K_M = 397 \mu\text{mol/mL}$; $V_{\max} = 1,1 \times 10^{-10} \mu\text{mol/min.mL}$], NADPH [$K_M =$

1,73 $\mu\text{mol/mL}$; $V_{\text{max}} = 6,32 \times 10^{-12} \mu\text{mol/min.mL}$] e amônia [$K_M = 992 \mu\text{mol/mL}$; $V_{\text{max}} = 7,9 \times 10^{-11} \mu\text{mol/min.mL}$]. Apesar de muitas substâncias inibirem a GLUDH – por ex., fumarato, glioxilato, íons (Co^{2+} , Ni^{2+} , dentre outros), L-homoserina – nenhuma delas estará presente no meio reacional. A constante de equilíbrio para esta enzima (K_{eq}) é de $4,5 \times 10^{-14} \text{M}$ (BERGMEYER, 1984). Esta enzima possui algumas aplicações conhecidas, como o uso em biossensores ou como catalisador para a regeneração de cofatores, o objetivo desse trabalho (BOLIVAR et al, 2009).

1.2. Imobilização dos Cofatores

O uso mais intenso de cofatores em reações de biocatálise tem sido limitado, devido aos altos custos dos mesmos (MESSING, 1975). Por exemplo, a redução de 1 mol de acetofenona ($\text{MM} = 96$) em metil fenil carbinol requer 1 mol de NADPH ($\text{MM} = 833$, na forma de sal tetrasódico). Um quilo de NADPH custa em torno de US\$ 5,000. Sem o reciclo do cofator, o custo total do NADPH necessário para esta transformação seria de US\$ 43,400 (correspondente a 10,42 moles de cofator). No entanto, se o cofator – adequadamente imobilizado em um suporte inerte - fosse reciclado, digamos, um total de 100 vezes, o custo do cofator cairia para algo em torno de US\$ 434 (WEST, 1996). Evidentemente, não seria razoável esperar o uso de enzimas que requerem cofatores na produção de commodities, mas usá-las para produzir substâncias de alto valor agregado seria uma possibilidade atraente do ponto de vista comercial.

A imobilização do cofator segue a lógica daquela usada para o caso de biocatalisadores (enzimas, células e organelas celulares), qual seja, ligá-lo por meios químicos e/ou físicos a um suporte inerte com retenção do seu poder oxi-red, além de possibilitar sua reutilização e/ou recuperação após o término da reação (ILLANES, 1994). Assim sendo, dispõe-se basicamente de três procedimentos para insolubilizar o cofator, a saber, por ligação covalente à superfície do suporte, por copolimerização (cofator e suporte interligados por ligações covalentes cruzadas) e por adsorção (consiste na adesão ou condensação de moléculas solúveis na superfície de sólidos).

Biocatalizadores imobilizados têm sido muito utilizados em escala industrial (TOMOTANI, 2006). Uma alta atividade específica e uma estratégia para remover as enzimas durante a recuperação dos produtos são pontos importantes para um eficiente sistema de reciclagem, porém é preciso aperfeiçoar a estabilidade da enzima durante a reação (BETANCOR, 2006).

Se houver a necessidade de aplicação de enzimas com alto grau de pureza, torna-se necessário a procura por estratégias eficientes para a reciclagem do cofator *in situ*. A maioria dos sistemas de reciclagem de cofatores é demonstrada utilizando-se desidrogenases (BETANCOR, 2006). Sabendo que o par enzima-cofator deve se formar durante a catálise e, uma vez terminada, devem se separar, então a decisão consiste em escolher entre os pares enzima imobilizada/cofator solúvel e enzima solúvel/cofator imobilizado, visto que, com a imobilização aumenta-se a capacidade catalítica da enzima e reduz-se o tempo de difusão do substrato (BETANCOR, 2006). Neste projeto, por envolver duas enzimas atuando de modo acoplado, optou-se em estudar a reação com as enzimas na forma solúvel e o cofator nas formas solúvel ou imobilizada, com a perspectiva de manter a entropia do sistema alta, já que a mobilidade do cofator em qualquer uma das formas seria pouco afetada. Esse aspecto é importante, sobretudo, porque a quantidade do cofator no meio reacional é pequena frente à do substrato a ser transformado. Com isto, no sistema a ser empregado neste trabalho, as formas oxidada (NADP/NAD) e reduzida (NADPH/NADH) interagiriam de modo alternado, respectivamente, com a G6PDH e a GLUDH (Figura 1).

Dentre as possibilidades de imobilização, optou-se pela adsorção do cofator em resina de troca iônica pela facilidade técnica do método, baseada na força interativa entre a carga da substância a ser adsorvida e a carga oposta da resina de troca iônica; pela disponibilidade, experiência na manipulação, atoxicidade e baixo custo do suporte e, quando desejado, a separação deles através do simples aumento da força iônica do meio (TOMOTANI, 2004; 2006).

A troca iônica é o intercâmbio reversível de íons entre um sólido e um líquido, não ocorrendo transformação substancial na estrutura da fase sólida. Uma resina pode ser visualizada como uma rede hidrocarbônica tridimensional e elástica, onde se ligam grupos químicos responsáveis pelo seu comportamento químico. Sua estabilidade depende da estrutura da matriz, do grau de intercruzamento e da natureza e número dos grupos ionizáveis. A rede hidrocarbônica deve ser resistente à oxidação, redução e à tensão mecânica, ser insolúvel em solventes orgânicos e ser constituída por partículas esféricas, favorecendo as propriedades hidrodinâmicas da resina (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

Há quatro tipos básicos de resinas trocadoras de íons, a saber, resinas de forte ou fraco caráter ácido (catiônicas) e resinas de forte ou fraco caráter básico (aniônicas).

O equilíbrio de “swelling” é a capacidade de retenção do solvente pelos grupos constituintes do material do suporte, que se expande até o ponto em que a resistência do material compensa a tendência de expansão. Essa propriedade pode ser favorecida pelos seguintes fatores: solventes polares, baixo grau de ligações cruzadas na resina, elevada capacidade de troca iônica, forte tendência de solvatação dos grupos iônicos fixos, forte solvatação contra íons, baixa valência contra íons, dissociação completa na resina e baixa concentração da solução externa (TOMOTANI, 2002).

Vários tipos de resinas podem ser preparadas com propriedades diferentes, como as resinas do tipo Dowex[®], cujos componentes básicos são o estireno copolimerizado com o divinilbenzeno. Tem como principal propriedade a seletividade, dependente, por sua vez, da temperatura, pressão, valência e natureza dos íons (TOMOTANI, 2002).

As resinas Dowex[®] contendo 2% (código 1X2), 4% (código 1X4) e 8% (código 1X8) de ligações cruzadas, são formadas por partículas contendo 2%, 4% e 8% de divinilbenzeno e 98%, 96% e 92% de estireno, respectivamente. O divinilbenzeno é responsável pela conformação tridimensional do polímero e por sua insolubilidade em certos solventes (TOMOTANI, 2002).

As propriedades físicas da resina Dowex[®] podem ser alteradas pelo número de ligações cruzadas da resina, afetando sua capacidade de entumescimento, e pela variação no tamanho das partículas, aumentando sua estabilidade física. Quanto maior o intercruzamento, menor é o grau de entumescimento (TOMOTANI, 2002).

O intercruzamento apresentado por uma resina Dowex[®] deve permitir uma expansão adequada do material, a fim de se acelerar a difusão de íons, estabelecendo rapidamente o equilíbrio iônico entre a solução e a resina (TOMOTANI, 2002).

Essa resina tem sido utilizada amplamente em biotecnologia, devido a suas relevantes propriedades, como estabilidade térmica (importante na adsorção de gases) e de “swelling” em função da temperatura. Entre outras aplicações, destacam-se a produção de L-cisteína, imobilização de enzimas ou células, produção de proteases, na imobilização de dextranases e lipases e a retirada de clorofila do óleo de canola (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

Finalmente, a resina Dowex foi escolhida para ser usada no presente trabalho por sua diversidade de uso, por sua fácil recuperação, ser um material inerte e atóxico, imobilizar biocatalisadores em condições brandas e pelo poder de retenção de macromoléculas (TOMOTANI, 2002).

1.3. Bioconversão

As bioconversões são reações químicas catalisadas por enzimas ou células, executadas em meio com alta ou baixa atividade de água. Seu sucesso se deve ao fato da transformação ser rigorosamente controlada, conduzida de modo contínuo sob condições brandas de pH e temperatura, a sua alta seletividade, a formação de efluentes menos tóxicos e facilmente tratáveis e a possibilidade de se executarem reações simultâneas.

A biocatálise aumenta proporcionalmente ao avanço da biotecnologia, resultando em maiores aplicações na indústria, como a conversão de insulina suína em humana. É relevante destacar a competição vantajosa da biocatálise frente aos processos tradicionais de extração e de fermentação. A eficiência da biocatálise depende do binômio biocatalisador/biorreator.

Segundo TOMOTANI (2006), biorreatores são equipamentos nos quais um agente de natureza biológica (células, enzimas, organelas celulares ou anticorpos) é utilizado para transformar um dado substrato em produto. Em termos operacionais o biorreator pode ser do tipo descontínuo ou contínuo.

O biorreator descontínuo, é preferido nos casos em que o biocatalisador é barato, não requer cofator ou possui meia vida curta. Apesar de ser o tipo mais simples para operação, tem o inconveniente de dificultar a recuperação do biocatalizador ao final do processo.

Neste projeto, usar-se-á o reator descontínuo – no qual o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e catalisador, além de ser facilmente operável e modelável (NEVES, 2006) – com a finalidade de estabelecer as faixas de trabalho dos parâmetros de processo, a saber, pH, temperatura, concentrações de cofator (solúvel ou insolúvel), dos substratos e das enzimas (G6PDH e GLUDH). Os referidos parâmetros servirão de base para fixar as condições operacionais do reator com membrana, no qual se objetiva executar por longo período de tempo a reação bienzimática com regeneração simultânea e contínua dos cofatores NADP (NAD)/NADPH (NADH).

O surgimento do biorreator contínuo deu-se por conta do grande desenvolvimento da técnica de imobilização de biocatalisadores (enzimas, células, etc.) Os biorreatores contínuos de amplo uso industrial podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber, os de leito fixo – cujo suporte contendo o biocatalisador imobilizado é

do tipo particulado (mais comum) ou uma superfície plana porosa (membrana de nano, micro ou ultrafiltração, cerâmica e materiais correlatos) – e os de leito fluidizado, nos quais o sistema imobilizado é mantido em suspensão.

Uma variante de reator de leito fluidizado é o chamado reator continuamente agitado (CSTR, na sigla em inglês), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material. Os biorreatores do tipo leito fluidizado e CSTR não possuem problemas relacionados ao estabelecimento de gradientes radiais ou axiais de pH, temperatura e concentrações de substrato e produto. Em geral, o CSTR acaba sendo a primeira escolha para o desenvolvimento de um novo processo, porque possui grande flexibilidade operacional (por exemplo, permite trabalhar com um amplo intervalo de velocidades de agitação) e de uso (não é desenhado para um processo em particular, podendo, inclusive, ser usado na configuração descontínua) (NEVES, 2006).

A adaptação de uma membrana de nano, micro ou ultrafiltração ao CSTR dá origem a um tipo particular de biorreator contínuo chamado **biorreator com membrana (BM)**, atualmente muito utilizado em tratamento de efluentes e reciclagem de água (LEE et al, 2009). Conforme o modo de acoplamento CSTR/membrana, resultam duas configurações básicas, a saber, a unimodular – a membrana é alojada na base do CSTR – e a bimodular, a membrana é alojada em um módulo especial associado em série com o CSTR (TOMOTANI, 2006; NEVES, 2006). Embora o transporte através da membrana possa se dar por difusão (a separação se baseia, apenas, no gradiente de concentração estabelecido entre as duas faces da membrana) ou por convecção (resultante do estabelecimento de um gradiente de pressão ou temperatura através da membrana), os BM mais usados, que requerem fluxos elevados, valem-se deste último mecanismo de transporte (CURCIO et al., 2002). A direção do fluxo introduzido no BM e a travessia do fluido através da membrana podem ser paralelos (ambos perpendiculares à superfície da membrana) ou perpendiculares entre si (o fluido alimentado tangencia a superfície da membrana e a travessia se dá perpendicularmente à superfície da mesma). Este último padrão de fluxo do BM é o mais indicado para evitar o fenômeno da polarização da membrana (BYHLIN e JONSSON, 2002; CURCIO et al., 2002).

No BM o biocatalisador poderá estar solúvel no meio reacional – neste caso a membrana, em geral de ultrafiltração, deverá ter porosidade adequada para evitar o escape do biocatalisador – ou ligado à membrana, caso em que se pode ter o

biocatalisador aprisionado na membrana, depositado na forma de gel sobre a superfície da membrana ou ligado através de interação química (adsorção, ligação iônica ou ligação covalente) (GIORNO e DRIOLI, 2000). A deposição da enzima sobre a membrana tem a desvantagem de proporcionar uma rápida desativação na maioria das enzimas, quando reduzidas ao acréscimo de catalisador durante o processo (HOLOWNIA e NOWORUTA, 2008). O fato do BM poder operar com o biocatalisador na forma solúvel, torna-o uma alternativa importante aos reatores tradicionais de biocatalisadores imobilizados (leito fixo, CSTR-tradicional, leito fluidizado) (PRAZERES e CABRAL, 1994). Salienta-se que o BM passa a ser mais atrativo que o CSTR-tradicional (não acoplado à membrana alguma) não só por poder operar com biocatalisadores solúveis, mas também pelas vantagens que apresenta, tais como, catálise homogênea, ausência de limitações difusionais, estéricas e conformacionais, alta atividade por unidade de volume, possibilidade de se trabalhar em condições assépticas, produtividade constante garantida pela constância da dosagem da enzima e possibilidade de sistemas multi-enzimáticos (ALFANI, et al., 1999). Além disso, o BM permite integrar em uma única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador. Estes aspectos, em princípio, podem promover significativa produtividade e redução de custos por ocasião da ampliação de escala (GIORNO e DRIOLI, 2000).

Os primeiros estudos sobre biorreatores com membrana tiveram início em 1970, resumindo-se na tentativa de hidrolisar amido à glicose, usando α -amilase retida em um sistema de filtração convencional. O principal problema observado relacionou-se à concentração de polarização da membrana, acarretando diminuição do fluxo ao longo do tempo e perda da enzima. O BM só começou a se tornar viável após os avanços ocorridos na tecnologia de membranas, as quais passaram a ser produzidas com espessura adequada, diâmetro e formato dos poros uniformes (microfiltração: 0,1-0,5 μ ; nanofiltração: menor que 2nm), além das características químicas definidas das mesmas (hidrofílicas, hidrofóbicas, neutras ou carregadas), as quais resultam da natureza dos materiais empregados (polímeros orgânicos como polisulfonas, celulose, acetato de celulose, politetrafluoretileno e polímeros inorgânicos) (SHIN e KANG, 2003). Em decorrência dos avanços nas características e na redução do custo das membranas, o BM passou a ser usado na produção de ampla variedade de produtos (ciclodextrinas, frutooligossacarídeos, catecol, ésteres, hidrolisados protéicos, dentre outros) (TOMOTANI, 2006). A esta lista, poder-se-á adicionar no futuro, produtos obtidos

através da ação de oxidorreduções dependentes de cofatores, cujas características oxirred sejam mantidas ao longo do processo.

Neste trabalho, pretende-se aplicar os conceitos discutidos através do emprego dos biorreatores descontínuo e contínuo (BM), com maior aplicabilidade para enzimas e coenzimas de alto custo, já que estes podem conduzir reações com catalisadores de diferentes origens para reciclagem dos cofatores (HUMMEL e KULA, 1989), para viabilizar o uso de oxidorreduções [NADP (NAD)/NADPH(NADH)]-dependentes, mantendo-se o caráter oxirred dos cofatores ao longo da reação. Espera-se contribuir para a difusão do uso de oxidorreduções aplicáveis às indústrias química, químico-farmacêutica e de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Viabilizar a interconversão contínua das formas oxidada e reduzida de cofatores β -nicotinamida adenínicos (NAD/NADH; NADP/NADPH) solúveis e imobilizados, usando as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), e glutamato desidrogenase (GLUDH).

2.2. Objetivos Específicos

- a) Estabelecer as condições de imobilização do NAD e do NADP em resina trocadora de ânions;
- b) Caracterização cinética da G6PDH;
- c) Caracterização cinética da GLUDH;
- d) Com o NADP ou NAD na forma solúvel ou imobilizada, estabelecer as condições das reações G6P/ (NADP) ou [NAD] /G6PDH//GLUDH/OXO/ (NADPH) ou [NADH] em regime descontínuo;
- e) Avaliar a execução das reações citadas com o cofator solúvel ou imobilizado em reator com membrana contínuo.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

- Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma);
- Glutamato desidrogenase (GLUDH) de fígado bovino (Sigma);
- NADP/NADPH e NADH/NAD (Sigma);
- Resinas Aniônicas Dowex[®] códigos 1x2, 1x4 e 1x8 e granulometria de 100 Mesh;
- Reagentes de grau P.A. de marcas tradicionais;

3.2. Equipamentos

- Espectrofotômetro Beckman-Coulter (Modelo DU 640);
- pHmetro Tecnal (Modelo Tech 3MP);
- Balança Analítica Shimadzu (Modelo AUW220D);
- Banho Termostático Fanem (Modelo 100);
- Freezer Eletrolux (Modelo FFE 24);
- Refrigerador Brastemp (Modelo B/X/PRF36).

3.3. Métodos

3.3.1. Técnicas Analíticas

3.3.1.1. Padronização dos reagentes de Somogyi

3.3.1.1.1. Preparação dos reagentes de Somogyi

A padronização do método foi determinada utilizando-se o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por TOMOTANI (2002). A forma de preparo e a formulação destes reagentes são apresentadas no anexo (item 1).

3.3.1.1.2. Estabelecimento da curva-padrão:

Em tubos de folin-wu colocou-se os volumes indicados na Tabela 1, sendo a mistura reativa constituída de 4 partes de Somogyi I e 1 parte de Somogyi II, (descritas no anexo). A seguir, colocaram-se os tubos em banho fervente por 10 min, retirando-os em seguida e os alocando em banho de gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 2,0 mL de Somogyi III (ver anexo) em cada tubo, agitando-os para remover os gases formados pela reação. Homogeneizaram-se os tubos e a cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro a 540nm, após repouso de 20 min.

Tabela 1: Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.

<i>Tubo (nº)</i>	<i>Solução de glicose (mL)</i>	<i>H₂O (mL)</i>	<i>Mistura Reativa (mL)</i>	<i>Somogyi III (mL)</i>
Branco	-	1,0	1,0	2,0
1	0,2	0,8	1,0	2,0
2	0,4	0,6	1,0	2,0
3	0,6	0,4	1,0	2,0
4	0,8	0,2	1,0	2,0
5	1,0	-	1,0	2,0

3.3.1.2. Determinação da proteína solúvel

Preparou-se cinco soluções de albumina, pesando-se 0,01g da proteína e acrescentando-se 5mL de solução de NaOH 5mM. Completou-se o volume com 100mL de água destilada. Na tabela 2, são indicadas as diluições que foram realizadas na própria cubeta do espectrofotômetro.

Tabela 2: Sistema montado para o estabelecimento da curva-padrão para a determinação de proteína solúvel.

<i>Tubo (nº)</i>	<i>Solução de albumina (mL)</i>	<i>H₂O (mL)</i>
Branco	-	1,0
1	0,1	0,9
2	0,2	0,8
3	0,3	0,7
4	0,4	0,6
5	0,5	0,5
6	0,6	0,4
7	0,7	0,3
8	0,8	0,2
9	0,9	0,1
10	1,0	-

Mediram-se cada diluição em espectrofotômetro com comprimento de onda de 215nm e 225nm, determinando-se, a seguir, a diferença entre os valores obtidos das respectivas absorbâncias.

3.3.1.3. Dosagem de Amônia

Preparou-se uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 5×10^{-4} M e distribuiu-se as soluções em tubos de ensaios juntamente com outros reagentes, de acordo com a tabela 3. Foram utilizados os reagentes de Nessler e o tampão Fosfato pH 7,0. Após esse procedimento, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Tabela 3: Sistema montado para o estabelecimento da curva-padrão para a dosagem de amônia.

<i>Tubo (mL)</i>	<i>NH₄⁺ (mL)</i>	<i>Tampão (mL)</i>	<i>Reativo de Nessler (mL)</i>	<i>H₂O (mL)</i>
Branco	-	1,0	1,0	8,0
1	1,0	1,0	1,0	7,0
2	2,0	1,0	1,0	6,0
3	3,0	1,0	1,0	5,0
4	4,0	1,0	1,0	4,0
5	5,0	1,0	1,0	3,0

3.3.1.4. Determinação da concentração de NADP solúvel.

Pesou-se 0,0034g de NADP (coeficiente de extinção molar: $18 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) e dissolveu-se em 10mL de água destilada, obtendo-se uma solução de concentração igual a 444,4 μM . A seguir, a solução foi diluída 10 vezes. Desta última, retiraram-se volumes entre 0,1 e 1mL, para proceder à leitura em cubeta de espectrofotômetro em $\lambda = 260\text{nm}$. Na tabela 4, apresentam-se os volumes das soluções tampão e de NADP colocadas na cubeta para registrar as absorbâncias correspondentes.

Tabela 4: Sistema montado para a determinação da concentração de NADP e NAD solúvel.

<i>Tubo</i>	<i>Solução de NADP 44,4µM (mL)</i>	<i>Tampão Tris (mL)</i>	<i>NADP (ug)</i>	<i>NAD (ug)</i>
Branco	-	1	-	-
1	0,1	0,9	34	2,95
2	0,2	0,8	68	5,90
3	0,3	0,7	102	8,84
4	0,4	0,6	136	11,8
5	0,5	0,5	170	14,7
6	0,6	0,4	204	17,7
7	0,7	0,3	238	20,6
8	0,8	0,2	272	23,6
9	0,9	0,1	306	26,5
10	1	-	340	29,6

3.3.1.5. Determinação da concentração de NAD solúvel.

Pesou-se 0,00295g de NAD (coeficiente de extinção molar: $18 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) e dissolveu-se em 10mL de água destilada, obtendo-se uma solução de concentração igual a 444,4 µM. A seguir, a solução foi diluída 10 vezes. Desta última, retiraram-se volumes entre 0,1 e 1mL, para proceder à leitura em cubeta de espectrofotômetro em $\lambda = 260\text{nm}$. Na tabela 4, apresentam-se os volumes das soluções tampão e de NAD colocadas na cubeta para registrar as absorbâncias correspondentes.

3.3.2. Caracterização da Glicose-6-Fosfato (G6PDH) quanto ao cofator NADP.

3.3.2.1. Medida da Atividade da G6PDH (NADP).

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 910µL de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; MgCl₂ 5mM), 10µL de G6PDH (0,1U), 40µL de G6P (0,3mM) e 40µL de NADP (100uM). A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADPH formado foi registrada a 340nm. Para o estabelecimento do erro padrão, a metodologia descrita foi repetida por cinco vezes, sendo determinados o coeficiente de variação e o desvio padrão.

3.3.2.2. Efeito do pH na atividade da G6PDH (NADP).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.2.1., porém alternando-se os experimentos entre os valores de pH: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

3.3.2.3. Efeito da temperatura na atividade da G6PDH (NADP).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.2.1., porém alternando-se os experimentos entre as temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C. A energia de ativação (E_a) da reação catalisada pela G6PDH foi calculada através da equação de Arrhenius, aplicada às temperaturas de 293K e 303K:

$$\text{Log } v_1/v_2 = E_a/2,303 \times R \times (T_2 - T_1)/T_1 \times T_2 \quad (\text{Eq. 1}).$$

Onde v_2 e v_1 são as atividades a T_2 (303K) e T_1 (293K), respectivamente, sendo o valor de $R = 8,314 \text{ J/mol} \times \text{K}$. O Q_{10} , por sua vez, foi calculado através da equação:

$$\text{Log } Q_{10} = 0,522 \times E_a/T_1 \times T_2 \quad (\text{Eq. 2}).$$

3.3.2.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH (NADP).

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os mesmos parâmetros estabelecidos na determinação da atividade enzimática (Item 3.3.2.1.), variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

3.3.2.5. Estabilidade da G6PDH (NADP) frente ao pH.

Para esse procedimento, foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3.2.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, com diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; e 8,5), armazenadas em banho a 30°C. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante as primeiras 2 horas, sendo a seguir retirada a cada 2h até que se completasse 10h. Após a décima hora, retirou-se apenas alíquotas na 24ª hora e na 30ª hora.

3.3.2.6. Estabilidade da G6PDH (NADP) frente à temperatura.

Neste caso, também se seguiu o descrito no item 3.3.2.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, em pH 7,5, sendo que essas estavam armazenadas à diferentes temperaturas em banho termoequilibrado (30, 35, 40 e 45°C).

3.3.2.7. Determinação das constantes cinéticas da G6PDH (NADP).

Para se determinar as constantes cinéticas da G6PDH (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), em relação ao NADP e a G6P, foram utilizados os parâmetros que determinaram um melhor desempenho enzimático, como mostrado no item 3.3.2.1., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado.

Os volumes de NADP e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado na tabela 5.

Tabela 5: Volume e concentração de NADP utilizado na determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

<i>Volume da Solução de NADP (uL)</i>	<i>[NADP] uM</i>
10	1
20	2
30	3
40	4
50	5
60	6
80	8
100	10
120	12
150	15
200	20

Os volumes de G6P e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado na tabela 6.

Tabela 6: Volume e concentração de G6P utilizado na determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

<i>Volume da Solução de G6P (uL)</i>	<i>[G6P] (mM)</i>
10	3,0
20	6,0
30	9,0
35	10,5
40	12,0
45	13,5
50	15,0
55	16,5
60	18,0
80	24,0
100	30,0

3.3.3. Caracterização da Glicose-6-Fosfato (G6PDH) quanto ao cofator NAD.

3.3.3.1. Medida da Atividade da G6PDH (NAD).

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 910 μ L de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; MgCl₂ 5mM), 10 μ L de G6PDH (0,1U), 40 μ L de G6P (0,3mM) e 40 μ L de 100 μ M NAD. A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADH formado foi registrada a 340nm.

3.3.3.2. Efeito do pH na atividade da G6PDH (NAD).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.3.1., porém alternando-se os experimentos entre os valores de pH: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

3.3.3.3. Efeito da temperatura na atividade da G6PDH (NAD).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.3.1., porém alternando-se os experimentos entre as temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C. A energia de ativação (E_a) e o Q_{10} da reação catalisada pela G6PDH foram calculados através das equações descritas no item 3.3.2.3.

3.3.3.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH (NAD).

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os mesmos parâmetros estabelecidos na determinação da atividade enzimática (Item 3.3.3.1.), variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

3.3.3.5. Estabilidade da G6PDH (NAD) frente ao pH.

Para esse procedimento, foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3.3.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, com diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; e 8,5), armazenadas em banho a 30°C. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante as primeiras 2 horas, sendo a seguir retirada a cada 2h até que se completasse 10h. Após a décima hora, retirou-se apenas alíquotas na 24^a hora e na 30^a hora

3.3.3.6. Estabilidade da G6PDH (NAD) frente à temperatura.

Neste caso, também se seguiu o descrito no item 3.3.3.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, em pH 7,5, sendo que essa estava armazenada a diferentes temperaturas em banho termoeletrificado (30, 35, 40 e 45°C).

3.3.3.7. Determinação das constantes cinéticas da G6PDH (NAD).

Para se determinar as constantes cinéticas da G6PDH (K_m e $V_{máx}$), em relação ao NAD e a G6P, foram utilizados os parâmetros que determinaram um melhor desempenho enzimático, como mostrado no item 3.3.3.1., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado.

Os volumes de NAD, de G6P e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado na tabela 7 e 8, contidas no item 3.3.2.7.

3.3.4. Caracterização da Glutamato Desidrogenase (GLUDH) quanto ao cofator NADPH.

3.3.4.1. Medida da Atividade da GLUDH (NADPH).

Em uma cubeta de espectrofotômetro, adicionou-se 70µL de 2-oxoglutarato (0,2M) e 100µL de Sulfato de Amônia (3,2 M), ambos substratos da enzima.

Posteriormente adicionou-se 720 μ L de tampão Tris pH 7,5 (0,05M; MgCl₂ 5mM), 10 μ L de NADPH (10mg/mL) e 100 μ L de GLUDH (4U). A reação foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda a 340nm, a 30°C, durante 180s, com medições de 30 em 30s. Esta metodologia foi adaptada de BERGMAYER (1984).

3.3.4.2. Efeito do pH na atividade da GLUDH (NADPH).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.4.1., porém testou-se o comportamento da enzima ante os diferentes valores de pH: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

3.3.4.3. Efeito da temperatura na atividade da GLUDH (NADPH).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.4.1., porém testando-se as temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C. A energia de ativação (Ea) e o Q₁₀ da reação catalisada pela G6PDH foram calculados através das equações descritas no item 3.3.2.3.

3.3.4.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade da GLUDH (NADPH).

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os mesmos parâmetros estabelecidos na determinação da atividade enzimática (Item 3.3.4.1.), variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

3.3.4.5. Estabilidade da GLUDH (NADPH) frente ao pH.

Utilizou-se a metodologia descrita no item 3.3.4.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, com diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; e 8,5), armazenadas em banho a 30°C. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante as primeiras 2 horas, sendo a seguir retirada a cada 2h até que se completasse 10h. Após a décima hora, retirou-se apenas alíquotas na 24^a hora e na 30^a hora.

3.3.4.6. Estabilidade da GLUDH (NADPH) frente à temperatura.

Neste caso, também se seguiu o descrito no item 3.3.4.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, em pH 7,5, sendo que essa estava armazenadas a diferentes temperaturas em banho termoestabilizado (30, 35, 40 e 45°C).

3.3.4.7. Determinação das constantes cinéticas da GLUDH (NADPH).

Para se determinar as constantes cinéticas da GLUDH (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), em relação ao NADPH, foram utilizados os parâmetros que determinaram um melhor desempenho enzimático, como mostrado no item 3.3.4.1., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado.

Os volumes de NADPH e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado na tabela 7.

Tabela 7: Volume e concentração de NADPH utilizado na determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

<i>Vol. NADPH (uL)</i>	<i>[NADPH] mg/mL</i>
20	0,02
30	0,03
40	0,04
50	0,05
80	0,08

3.3.5. Caracterização da Glutamato Desidrogenase (GLUDH) quanto ao cofator NADH.

3.3.5.1. Medida da Atividade da GLUDH (NADH).

Em uma cubeta de espectrofotômetro, adicionou-se 70 μ L de 2-oxoglutarato (0,2M) e 100 μ L de Acetato de Amônia (3,2 M), ambos substratos da enzima. Posteriormente adicionou-se 720 μ L de tampão Tris pH 7,5 (0,05M; MgCl₂ 5mM), 10 μ L de NADPH (10mg/mL) e 100 μ L de GLUDH (4U). A reação foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda 340nm, 30°C, durante 180s, com medições de 30 em 30s. Esta metodologia foi adaptada de BERGMEYER (1984).

3.3.5.2. Efeito do pH na atividade da GLUDH (NADH).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.5.1., porém testou-se o comportamento da enzima ante os diferentes valores de pH: 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

3.3.5.3. Efeito da temperatura na atividade da GLUDH (NADH).

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.5.1., porém testando-se as temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C. A energia de ativação (E_a) e o Q_{10} da reação catalisada pela G6PDH foram calculados através das equações descritas no item 3.3.2.3.

3.3.5.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade da GLUDH (NADH).

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os mesmos parâmetros estabelecidos na determinação da atividade enzimática (Item 3.3.5.1.), variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

3.3.5.5. Estabilidade da GLUDH (NADH) frente ao pH.

Utilizou-se a metodologia descrita no item 3.3.5.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, com diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; e 8,5), armazenadas em banho a 30°C. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante as primeiras 2 horas, sendo a seguir retirada a cada 2h até que se completasse 10h. Após a décima hora, retirou-se apenas alíquotas na 24ª hora e na 30ª hora

3.3.5.6. Estabilidade da GLUDH (NADH) frente à temperatura.

Neste caso, também se seguiu o descrito no item 3.3.5.1., sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, em pH 7,5, sendo que essa estava armazenadas a diferentes temperaturas em banho termoequilibrado (30, 35, 40 e 45°C).

3.3.5.7. Determinação das constantes cinéticas da GLUDH (NADH).

Para se determinar as constantes cinéticas da GLUDH (K_m e $V_{máx}$), em relação ao NADH, foram utilizados os parâmetros que determinaram um melhor desempenho enzimático, como mostrado no item 3.3.5.1., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado. Essas concentrações encontram-se na tabela 7 do item 3.3.4.7..

3.3.6. Imobilização de cofatores (NAD e NADP)

3.3.6.1. Preparação das amostras para a imobilização

Pesou-se 50mg de resinas de troca iônica (Dowex®, Sigma) de diferentes porcentagens de ligações cruzadas (códigos 1x2, 1x4 e 1x8) e granulometria de 100 Mesh, selecionadas por TOMOTANI (2002). Essas resinas foram lavadas em 25 mL de água destilada com pH ajustado para 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. As misturas foram mantidas em shaker por 24h, a 30°C e 100rpm.

Após as 24h, centrifugou-se as misturas por 30 min e 3000 x g e descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se a resina a 20 mL de água destilada com o pH ajustado e 5 mL de cofator NADP ou NAD ($2,22 \times 10^{-5}$ moles de soluto em água destilada com o pH ajustado). Alocou-se a mistura novamente no shaker por mais 4h, a 30°C e 100rpm. Após o período, centrifugaram-se as amostras novamente nas mesmas condições indicadas acima. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante e essa foi medida em espectrofotômetro a 260nm.

3.3.6.2. Eficiência da Imobilização

Para calcular a eficiência da imobilização, foi utilizada a seguinte equação:

$$EI = [(Abs_{\text{Adicionada}} - Abs_{\text{Sobrenadante}}) / Abs_{\text{Adicionada}}] \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde $Abs_{\text{Adicionada}}$ é a medida da absorbância da solução dos cofatores e $Abs_{\text{sobrenadante}}$ refere-se à medida de absorbância do sobrenadante após a centrifugação.

3.3.7. Regeneração do NADP/NADPH na forma solúvel em regime descontínuo.

3.3.7.1. Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH

Para a reação conjunta, primeiramente preparou-se somente os substratos para a reação da G6PDH, conforme o ensaio padrão para essa enzima (Item 3.3.2.1.), exceto para a G6P cujo volume e concentração foram alterados para, respectivamente, 500μL e 50mM. A reação foi realizada a 30°C e a 40°C em pH 7,3 (média estabelecida considerando-se o pH ótimo da G6PDH e da GLUDH), durante 4 min. Após esse período, acrescentou-se os substratos para a reação da GLUDH, juntamente com a enzima. Deixou-se reagir por 10min, nas condições descritas no item 3.3.4.1. Passado o

tempo, interrompeu-se a reação deixando-se os tubos em banho fervente por 5 min. Repetiu-se o mesmo procedimento para outras amostras, para os seguintes tempos de reação acoplada: 20 min, 30 min, 40 min, 50 min e 60 min.

Para verificar a ocorrência da reação, bem como seu rendimento, mediu-se a quantidade dos cofatores NADP e NADPH a 260nm e 340nm, bem como a quantidade de amônia, através do reativo de Nessler (Item 3.3.1.3.) e de G6P, através do método de Somogyi (Item 3.3.1.1.).

3.3.7.2. *Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala*

Nesse item, os procedimentos adotados foram os mesmos do item 3.3.7.1, porém o meio reacional foi ampliado em dez vezes e, conseqüentemente, o volume dos reagentes, de acordo com a tabela 8. A reação com escala ampliada foi feita a 30° e a 40°C.

Tabela 8: Volumes dos reagentes para o sistema de reação acoplada

<i>Reagente</i>	<i>Volume inicial (μL)</i>	<i>Volume Ampliado em 10X (μL)</i>
Tampão Tris	290	2900
NADP/NAD	40	400
G6P	500	5000
G6PDH	10	100
NH ₄ ⁺	100	1000
2-oxoglutarato	70	700
GLUDH	100	1000

3.3.7.3. *Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala e com o NADP imobilizado.*

Os procedimentos adotados seguem o especificado no item 3.3.7.2, com a exceção da solução de NADP, que foi imobilizado de acordo com o descrito no item 3.3.6.

3.3.8. **Regeneração do NAD/NADH na forma solúvel em regime descontínuo.**

3.3.8.1. *Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala*

No caso do cofator NAD, foram feitos testes apenas com ampliação de escala, seguindo-se as condições descritas no item 3.3.7.2.

3.3.8.3. Reação acoplada da G6PDH e da GLUDH com ampliação de escala e com o NAD imobilizado.

Neste item, o procedimento seguido encontra-se descrito no item 3.3.7.3.

3.3.9. Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma solúvel em regime contínuo.

Para esse procedimento utilizou-se um reator com membrana Bioengineering® e uma membrana Millipore® de 100kDa. No reator acrescentou-se 1000µL de GLUDH, 100µL de G6PDH e 400µL de NADP/NAD. O fluxo da bomba pistonada foi ajustado para 10mL/h ou 20mL/h e a reação foi conduzida a 30°C ou 40°C. Para iniciar-se a reação, fechou-se o reator de forma hermética, alimentando-o com o substrato G6P (50mM) por uma hora. Aliquotas foram recolhidas a cada 15min. Após a primeira hora, seguiu-se a alimentação conjunta com os substratos sulfato de amônia (3,2M), 2-oxoglutarato (0,2M) e G6P (50mM). O reator foi alimentado com essa solução de substratos pela 29h seguintes, sendo que alíquotas foram recolhidas de hora em hora por um coletor de frações.

Nas amostras foram determinadas as concentrações residuais de amônia e ART através dos métodos do reativo de Nessler e de Somogyi, respectivamente.

Nos ensaios seguintes, o reator foi alimentado alternadamente com uma solução de G6P (50mM) por uma hora seguida de uma solução de 2-oxoglutarato (0,2M) e sulfato de amônia (3,2M) por duas horas. Ao término do ensaio, foram feitas as mesmas determinações descritas acima.

3.3.10. Regeneração do NADP/NADPH na forma imobilizada em regime contínuo.

Seguiu-se o procedimento descrito no item 3.3.9., porém o cofator foi imobilizado segundo o descrito no item 3.3.6. e acrescentado ao reator.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da Glicose-6-Fosfato (G6PDH) quanto ao cofator NADP

4.1.1. Padronização da Atividade Enzimática

De acordo com o item 3.3.2.1., a atividade padrão da G6PDH foi estabelecida, como ilustra a figura 2.

Figura 2: Formação de NADPH em função do tempo, resultante da oxidação da G6P pela G6PDH em presença de NADP. A reação foi executada em cubeta de 1cm em $\lambda=340\text{nm}$ a 30°C e pH 7,5. A reta de regressão linear é: $y = 0,0368t + 1,781$ ($r = 0,998$).

A atividade da G6PDH frente ao cofator NADP foi de $0,0368\mu\text{M}$ de NADPH formado/s. O desvio padrão encontrado nos testes em quintuplicata foi de $0,0021\mu\text{M}$ e o coeficiente de variação foi de 5,5%.

4.1.2. Efeito do pH na atividade da enzima.

Procedimento realizado de acordo com o item 3.3.2.2., apenas variando-se o valor do pH em cada teste.

Figura 3: Variação da atividade da G6PDH em diferentes valores de pH, usando o NADP como cofator.

Observou-se maior atividade da G6PDH frente ao NADP em pH 7,5 (0,0368 μ M de NADPH formado/s), sendo este pH adotado como padrão para os demais testes.

4.1.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

Foram variadas as temperaturas do teste conforme descrito no item 3.3.2.3..

Figura 4: Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas, usando o NADP como cofator.

Pode-se concluir que a temperatura ótima da enzima é de 30 $^{\circ}$ C, com atividade de 0,0368 μ M de NADP formado/s, sendo essa temperatura adotada como padrão. Após os cálculos com as equações descritas no item 3.3.2.3., a energia de ativação e o Q_{10} foram, respectivamente, iguais a 17,84 kJ/mol e 1,27.

4.1.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade da G6PDH.

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram a metodologia descrita no item 3.3.2.4., variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

Figura 5: Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas [(●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C] combinadas com diferentes valores de pH.

A partir da figura 5, infere-se que a maior atividade da enzima caracteriza-se quando esta é submetida a 45°C e pH 7,5 (0,0338 uM/s). Porém, a enzima não permanece estável quando submetida a essas condições por longo período de tempo, como se pode verificar no item seguinte. Pela tabela 9, observa-se que o coeficiente de variação, quando se fixa a temperatura e se varia o pH, é maior do que aquele da condição inversa. Por isso, pode-se concluir que o pH afeta a atividade da enzima mais intensamente do que a temperatura.

Tabela 9: Atividade da G6PDH em relação ao pH e à temperatura, usando a coenzima NADP.

	30°C	35°C	40°C	45°C			
pH	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Média	DP	CV
7,0	0,0203	0,0186	0,0182	0,0169	0,0185	0,0014	8%
7,5	0,0278	0,0253	0,0265	0,0338	0,0284	0,0038	13%
8,0	0,0236	0,0276	0,0256	0,0221	0,0247	0,0024	10%
8,5	0,0199	0,0187	0,0199	0,0192	0,0194	0,0006	3%
Média	0,0229	0,0226	0,0226	0,0230			
DP	0,0037	0,0046	0,0041	0,0075			
CV	16%	20%	18%	18%			

4.1.5. Estabilidade da G6PDH frente ao pH.

Para este teste, foi utilizado o procedimento descrito no item 3.3.2.5.

Figura 6: Estabilidade da G6PDH frente aos valores de pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□) pH 8,5], por um período de 2h a 30°C.

Figura 7: Estabilidade da G6PDH frente aos valores de pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□) pH 8,5], por um período de 30h a 30°C.

Das figuras 6 e 7, observa-se que os perfis das curvas são bem semelhantes, embora duas a duas nitidamente separadas, ficando os valores das atividades nos intervalos (0,05-0,04uM/s) e (0,03-0,02uM/s), respectivamente, nos valores de pH (7,0-7,5) e (8,0-8,5).

Considerando os coeficientes de variação entre 7 e 12% (Tabela 4A no anexo) para a atividade da G6PDH, ao longo de 30h, conclui-se que o pH afeta moderadamente a atividade da enzima.

Com relação ao pH 7,0, 7,5 e 8,0, a atividade diminuiu, respectivamente, 26,8, 13,2 e 3,5% no período de 10 a 24h de experimento. Nesse mesmo período, a enzima submetida em pH 8,5 aumentou sua atividade em 6,53% (Tabela 5A do anexo).

4.1.6. Estabilidade da G6PDH frente à temperatura.

O experimento seguiu de acordo com o descrito no item 3.3.2.6..

Figura 8: Estabilidade da G6PDH submetida a diferentes temperaturas [(●) 30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C] por um período de 2h, em pH 7,5.

Figura 9: Estabilidade da G6PDH submetida a diferentes temperaturas [(●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C] por um período de 30h, em pH 7,5.

Pode-se concluir das figuras 8 e 9 que a G6PDH ao ser submetida às temperaturas de 35, 40 e 45°C, sofre desnaturação que se intensifica à 45°C.

Analisando-se também os dados da Tabela 2A do anexo, pode-se inferir que, para temperaturas acima de 35°C, a perda de atividade é alta, sendo a variação das atividades acompanhadas por um período de 30h, superior a 39%, sendo que a 45°C a queda na atividade chega a 100%. Já para 30°C, as variações dos valores das atividades foram da ordem de 9,3%. Logo, a temperatura de reação catalisada pela G6PDH será fixada em 30°C. Os maiores coeficientes de variância encontram-se entre os períodos de 10 a 24h, nas temperaturas maiores ou iguais à 35°C, o que demonstra a alta variabilidade da atividade da G6PDH nesse período (Tabela 3A do anexo).

Da figura 9, observa-se que a diminuição da estabilidade da G6PDH às temperaturas de 40 e 45°C é muito intensa, podendo a perda de atividade estar associada à desnaturação irreversível da molécula de G6PDH. Para verificar este aspecto, decidiu-se estimar as constantes de desnaturação térmica a 40°C (K_{d40}) e 45°C (K_{d45}), usando-se o método convencional de Arrhenius, adaptado segundo OWUSU e MARKHZOUM (1992).

Os dados referentes à atividade da G6PDH em função do tempo a duas temperaturas fixas são apresentadas na tabela 10. As constantes de desnaturação térmica foram calculadas a partir das curvas mostradas na figura 10.

Tabela 10: Atividade da G6PDH em função do tempo (intervalos: zero a 1,5h) a duas temperaturas.

Tempo (h)	40°C		45°C	
	v_{40}	Log v_{40}	v_{45}	log v_{45}
0,00	-	-	-	-
0,25	0,0342	-1,46597	0,0240	-1,61979
0,50	0,0326	-1,48678	0,0160	-1,79588
0,75	0,0318	-1,49757	0,0112	-1,95078
1,00	0,0309	-1,51004	0,00600	-2,22185
1,25	0,0298	-1,52578	0,00390	-2,40782
1,50	0,0288	-1,54061	-	-

Figura 10: Logaritmo da atividade da G6PDH em função do tempo para as temperaturas de 40° (○) e 45°C (●). As equações das retas são: $\text{Log } v_{40} = -0,059t - 1,452$ ($r = 0,991$) e $\text{Log } v_{45} = -0,8t - 1,406$ ($r = 0,998$).

A energia de ativação da desnaturação térmica (E_a^*), a correspondente entalpia (ΔH^*) e suas meias vidas foram calculadas através das equações:

$$\text{Log } Kd_{45}/Kd_{40} = E_a^*/2,303 \times R \times (T_2 - T_1)/T_1 \times T_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\Delta H^* = E_a^* - RT \quad (\text{Eq. 4})$$

$$t_{1/2} = \text{Ln}2/Kd \quad (\text{Eq.5})$$

Tabela 11: Valores das constantes de desnaturação térmica para $T = 40^\circ\text{C}$ e $T = 45^\circ\text{C}$, da energia de ativação da desnaturação térmica, da entalpia de desnaturação térmica e as correspondentes meias-vidas.

$E_a^* \text{ (kJ/mol)}$	$\Delta H^* \text{ (kJ/mol)}^*$	$Kd_{40} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$Kd_{45} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2(40)} \text{ (h)}$	$t_{1/2(45)} \text{ (h)}$
432	429	0,059	0,8	11,7	0,9

* O valor corresponde a média dos valores da entalpia a 40°C e a 45°C .

De acordo com OWSU e MARKZOOM (1992), os valores de ΔH^* entre 200 e 300 kJ/mol indicam o desenovelamento da estrutura terciária e ou quaternária levando à desnaturação irreversível da mesma. No caso da G6PDH, o ΔH^* é bem acima do limite superior do intervalo proposto pelos autores, sendo, provavelmente, devido à estrutura quaternária complexa desta enzima.

A estabilidade operacional da G6PDH frente à temperatura pode ser estimada através de valores da meia-vida da enzima calculados a 40°C e 45°C , que foram 11,7h e

0,9h respectivamente. Concluiu-se que, para esta enzima, a temperatura máxima de trabalho não pode ultrapassar 40°C.

4.1.7. Determinação das constantes cinéticas

Para se determinar as constantes cinéticas da G6PDH (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), na presença de NADP, foram utilizados os parâmetros que determinaram um melhor desempenho enzimático, de acordo com o item 3.3.2.7., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado.

Na figura 11, apresenta-se a variação da atividade da G6PDH em função da concentração inicial de NADP.

Figura 11: Atividade da G6PDH nas diferentes concentrações de NADP.

Para a obtenção de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foi aplicado o método de Lineweaver-Burk (Figura 12).

Figura 12: Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o gráfico de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta: $1/v = 139,44(1/s) + 90,95$ ($r = 0,992$).

O valor de K_m foi 15,3uM e de $V_{m\acute{a}x}$ foi 0,11 uM/s. O valor de K_m é o dobro do especificado por BERGMEYER (1984). Esta diferença, provavelmente, resulta dos ensaios não terem sido feitos nas mesmas condições (pH, temperatura e concentração de G6P). Quanto à concentração de substrato, BERGMEYER (1984) usou solução na concentração de 0,15M, ao passo que no presente trabalho foi de 0,3mM. A diferença nas concentrações iniciais de G6P não afeta o desempenho catalítico da G6PDH, porque a reação catalisada por ela está totalmente deslocada no sentido da formação do NADPH.

Na figura 13, apresenta-se a variação da atividade da G6PDH em função da concentração inicial de G6P.

Figura 13: Atividade G6PDH nas diferentes concentrações de G6P.

Com o objetivo de se obter as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$, aplicou-se o método de Lineweaver-Burk (figura 14).

Figura 14: Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta $1/v = 182,41(1/s) + 7,03$ ($r = 0,9994$).

As constantes cinéticas obtidas são: $K_m = 25,9 \text{ mM}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,142 \text{ mM/s}$. O valor de K_m determinado foi cerca de 28% inferior àquele proposto por BERGMEYER (1984), que era igual a 36mM.

4.2. Caracterização da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase quanto ao cofator NAD

4.2.1. Padronização da Atividade Enzimática

De acordo com o item 3.3.3.1., fez-se o teste em quintuplicata.

Figura 15: Formação de NADH em função do tempo, resultante da oxidação da G6P pela G6PDH em presença de NAD. A reação foi executada em cubeta de 1 cm de caminho óptico em $\lambda = 340\text{nm}$ a 30°C e pH 7,5. A reta de regressão linear é:

$$y = 0,0199t + 0,07103; r = 0,994.$$

A atividade da G6PDH frente ao cofator NAD foi de 0,020 de NADH formado/s. O desvio padrão encontrado foi de $0,0072\mu\text{M}$, o coeficiente de variação foi de 5,67%. A atividade da G6PDH frente ao NAD foi aproximadamente 1,6x menor quando comparado à atividade frente ao NADP, concordando com o especificado pelo fabricante da enzima (Catálogo Sigma, 1995).

4.2.2. Efeito do pH na atividade da enzima.

Para esse teste, seguiu-se o descrito no item 3.3.3.2.

Figura 16: Variação da atividade da G6PDH em diferentes pHs, usando NAD como cofator.

A partir da figura 16, observou-se maior atividade da G6PDH frente ao NAD em pH 7,5 (0,016 μ M de NADH formado/s), sendo este pH adotado como padrão para os demais testes, exatamente como adotado para o cofator NADPH. A diferença de atividade entre o pH 7,0 e 8,0 foi apenas 4,3%, ou seja, menor que o coeficiente de variação. Portanto, a enzima atuou muito bem em pH 7,5 e 8,0. No caso do NADP, o pH ótimo foi 7,5.

4.2.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

O procedimento está relacionado no item 3.3.3.3.

Figura 17: Variação da atividade da G6PDH em diferentes temperaturas, usando o NAD como cofator.

Da Figura 17, observa-se que a maior atividade da G6PDH, quando o cofator empregado foi o NAD, ocorreu a 35°C.

Tabela 12: Atividade da G6PDH, em presença de NAD, de acordo com a temperatura.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Atividade (uM/s)</i>
30	0,0200
35	0,0207
40	0,0195
45	0,0202

A diferença de atividade entre a enzima submetida a 30 e 35°C é de 3,38%. Porém, quando foi utilizado o NADP essa diferença subiu para 18%. A energia de ativação obtida (E_a) da reação catalisada pela G6PDH na presença de NAD foi calculada através da eq.1, aplicada às temperaturas de 303K e 308K. Encontrou-se o valor de 5,34 kJ/mol, cerca de 3,3 vezes menor do que aquela frente ao NADP. Dado o fato que a G6PDH é uma enzima formada por duas cadeias peptídicas, seria possível assumir que na presença do NAD, o estado de transição termodinâmico da reação exigiria menos energia para ser alcançado. Todavia, a modificação conformacional da estrutura quaternária da enzima, provocada pelo NAD, não seria tão adequada para uma atividade catalítica maior do que aquela provocada pelo NADP. Provavelmente, este fato explicaria o porquê da condição de menor E_a apresentar atividade catalítica menor do que a condição de maior E_a .

4.2.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram o estabelecido no item 3.3.3.4. variando-se apenas os pHs e as temperaturas em diferentes combinações.

Figura 18: Variação da atividade da G6PDH, na presença do NAD, em diferentes temperaturas [(●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C] combinadas com diferentes valores de pH.

A partir da Figura 18, infere-se que a maior atividade da enzima caracteriza-se quando esta é submetida a 30°C e pH 7,5 (0,0220 uM/s), diferentemente quando da utilização do NADP. Porém, o comportamento da enzima foi semelhante nos dois casos, quando comparamos as figuras 5 e 18.

Pela tabela 13, observa-se que o coeficiente de variação, quando se fixa a temperatura e se varia o pH, é maior do que aquele da condição inversa. No caso do pH o CV é superior a 35%, enquanto para a temperatura é inferior a 12%. Por isso, pode-se concluir que o pH afeta a atividade da enzima mais intensamente do que a temperatura.

Tabela 13: Atividade da G6PDH em relação ao pH e à temperatura

	30°C	35°C	40°C	45°C			
pH	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Média	DP	CV
7,0	0,0076	0,0064	0,0072	0,0070	0,0070	0,0005	7%
7,5	0,0220	0,0177	0,0200	0,0179	0,0194	0,0020	10%
8,0	0,0188	0,0187	0,0184	0,0175	0,0184	0,0006	3%
8,5	0,0151	0,0155	0,0120	0,0131	0,0139	0,0017	12%
Média	0,0159	0,0146	0,0144	0,0139			
DP	0,0062	0,0056	0,0059	0,0051			
CV	39%	39%	41%	37%			

4.2.5. Estabilidade da G6PDH frente ao pH.

A estabilidade da enzima foi testada de acordo com o item 3.3.3.6..

Figura 19: Estabilidade da G6PDH em presença de NAD frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 2h a 30°C.

Figura 20: Estabilidade da G6PDH em presença de NAD frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 30h a 30°C.

Nas figuras 19 e 20 não se observa a mesma dicotomia entre os pHs 7,0 e 7,5 e os pHs 8,0 e 8,5. Nas primeiras dez horas, o pH que sofreu menor variação na atividade da G6PDH foi o pH 8,0, que apresentou CV de 6,53% (tabela 7A do anexo). Entre 10 e 24h, observou-se a queda acentuada da atividade em pH 8,5, da ordem de 61,64% (Tabela 6A do anexo), enquanto que no intervalo entre 24 e 30h, a atividade manteve-se

constante nesse pH e caindo nos outros. Pode-se dizer que, nesse intervalo, houve praticamente a perda definitiva da atividade da G6PDH.

4.2.6. Estabilidade da G6PDH frente à temperatura.

Figura 21: Estabilidade da G6PDH em presença de NAD submetida às temperaturas de (◆)30°C e (■) 45°C por um período de 2h em pH 7,5.

Figura 22: Estabilidade da G6PDH em presença de NAD submetida às temperaturas de (●)30°C e (□) 45°C por um período de 30h em pH 7,5.

Neste caso, o teste foi realizado em duas temperaturas diferentes para confirmar o comportamento semelhante da atividade enzimática com os dois diferentes cofatores (Item 3.3.3.6.). Como era esperado, confirma-se a estabilidade a 30°C e a desnaturação a 45°C.

4.2.7. Determinação das constantes cinéticas

Para determinar as constantes cinéticas da G6PDH (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), na presença de NAD, foram utilizados os parâmetros descritos no item 3.3.3.7., variando-se apenas a concentração do substrato utilizado.

Os volumes de NAD e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o item 4.3.3.7.. Na figura 23, apresenta-se a variação da atividade da G6PDH em função da concentração inicial de NAD.

Figura 23: Atividade da G6PDH nas diferentes concentrações de NAD.

Para a obtenção de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foi aplicado o método de Lineweaver-Burk (Figura 24).

Figura 24: Determinação das constantes cinéticas da G6PDH empregando o método de Lineweaver –Burk, sendo a equação da reta: $y = 30,92(1/s) + 2,56$ ($r = 0,995$).

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ calculados foram iguais à $12,4\mu M$ e $0,04\mu M/s$, respectivamente. O valor de K_m encontrado difere daquele apresentado por BERGMEYER (1984), que é igual a $115\mu M$. As diferentes condições de ensaio, provavelmente, explicariam essa divergência.

Os volumes de G6P e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado no item 3.3.3.7.. Na figura 25, apresenta-se a variação da atividade da G6PDH em função da concentração inicial de G6P.

Figura 25: Atividade da G6PDH em presença de NAD nas diferentes concentrações de G6P.

Para a obtenção dos valores de K_m ($44,7\mu M$) e $V_{m\acute{a}x}$ ($0,115\mu M/s$), utilizou-se o método de Lineweaver-Burk (Figura 26).

Figura 26: Determinação das constantes cinéticas da G6PDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta $1/v = 391,7(1/s) + 7,58$ ($r = 0,992$).

Segundo BERGMEYER (1984), o K_m da G6PDH frente ao NAD é igual a $64\mu\text{M}$, ou seja, 30% superior ao calculado neste trabalho. As já aludidas diferenças de condições de ensaios poderiam justificar essa diferença.

4.3. Caracterização da Glutamato-desidrogenase (GLUDH) quanto ao cofator NADPH.

4.3.1. Padronização da atividade enzimática

A padronização da atividade da GLUDH foi feita de acordo com o descrito no item 3.3.4.1., sendo os testes realizados em quintuplicata.

Figura 27: Consumo de NADPH em função do tempo resultante da redução de 2-oxoglutarato pela glutamato desidrogenase (GLUDH). A reta de regressão linear é: $y = -0,0245t + 135,85$; ($r = 0,997$), onde y corresponde à concentração de NADPH consumido.

A atividade da GLUDH frente ao NADPH foi de $0,0245\mu\text{M}$ de NADPH consumido/s, isso porque a enzima oxida o cofator levando-o à NADP. O desvio padrão encontrado nos teste foi de $2 \times 10^{-5} \text{mg/mLxs}$ e o coeficiente de variação foi de 6%.

4.3.2. Efeito do pH na atividade da enzima.

Figura 28: Variação da atividade da GLUDH em diferentes pHs, usando o NADPH como cofator.

Após a realização dos testes de acordo com o item 3.3.4.2., apenas variando-se o valor do pH em cada reação, observou-se maior atividade da GLUDH frente ao NADPH em pH 7,0 (0,01630 mg/mL de NADPH consumido/s). O fabricante da enzima (Sigma, catálogo 1995), indica o pH 7,3 e 25°C, enquanto BERGMEYER (1984) indica pH 7,5 e 25°C.

4.3.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

A influência da temperatura na atividade da GLUDH foi obtida de acordo com o item 3.3.4.3..

Figura 29: Variação da atividade da GLUDH em diferentes temperaturas, usando o NADPH como cofator.

Da figura 29 observa-se que v_{GLUDH} aumentou linearmente com a temperatura, quando esta foi variada entre 30°C e 45°C. Embora a GLUDH tenha apresentado atividade alta a 45°C (Tabela 14), decidiu-se fixar a 30°C como temperatura reacional, levando em conta a estabilidade da G6PDH – enzima parceira da GLUDH no sistema bienzimático – a 30°C por 30h (Fig. 7).

Tabela 14: Atividade da GLUDH em função da variação de temperatura

<i>Temperatura °C</i>	<i>Atividade (mg/mL*s)</i>
30	0,0209
35	0,0318
40	0,0427
45	0,0536

A energia de ativação e o Q_{10} , calculados como anteriormente, são, respectivamente, 52,5kJ/mol e 1,92.

4.3.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os parâmetros estabelecidos no item 3.3.4.4., combinando-se diferentes pHs e temperaturas.

Figura 30: Variação da atividade da GLUDH, na presença de NADPH, em diferentes temperaturas combinadas com diferentes pHs: (●) 30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C.

A partir da figura 30, infere-se que a maior atividade da enzima se caracteriza quando esta é submetida a pH 7,0 independentemente da temperatura. Em pH 8,0, no entanto, observa-se que a atividade da GLUDH é afetada pela temperatura. Considerando os coeficientes de variação indicados na tabela 15 para a condição de pH fixo e temperatura diferente (5,3%-28,6%) e a condição inversa (60,3%-72,5%), conclui-se que a variação do pH afeta a atividade da GLUDH mais intensamente do que a variação da temperatura. O efeito intenso do pH, provavelmente, resulta da complexidade da estrutura quaternária da GLUDH, que é constituída por seis cadeias peptídicas (PETERSON e SMITH, 1999).

Tabela 15: Atividade da GLUDH em relação ao pH e à temperatura

	30°C	35°C	40°C	45°C			
pH	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Média	DP	CV
7,0	0,358	0,321	0,330	0,320	0,332	0,018	5%
7,5	0,042	0,043	0,053	0,069	0,052	0,013	24%
8,0	0,199	0,173	0,212	0,320	0,226	0,065	29%
8,5	0,141	0,126	0,094	0,139	0,125	0,022	17%
Média	0,185	0,166	0,172	0,212			
DP	0,132	0,117	0,125	0,128			
CV	72%	70%	73%	60%			

4.3.5. Estabilidade da GLUDH frente ao pH.

De acordo com o item 3.3.4.5., obtiveram-se os seguintes resultados:

Figura 31: Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 2h a 30°C.

Figura 32: Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 30h a 30°C.

A partir da tabela 10A do anexo, nota-se que para um mesmo tempo de submissão aos diferentes valores de pH, o coeficiente de variação chegou a 54%. Para um mesmo pH, o CV variou de 13% (pH 8,0) a 42% (pH 7,5). Portanto, novamente se verifica a influência do pH na variação da atividade.

4.3.5. Estabilidade da GLUDH frente à temperatura.

Os experimentos seguiram o procedimento descrito no item 3.3.4.6.

Figura 33: Estabilidade da GLUDH submetida às temperaturas de (●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C por um período de 2h, em pH 7,5.

Figura 34: Estabilidade da GLUDH submetida às temperaturas de (●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C por um período de 30h, em pH 7,5.

Das tabelas 8A e 9A do anexo, observa-se que para um mesmo tempo de submissão às temperaturas consideradas, o coeficiente de variação nunca é inferior a 21%. Já para uma mesma temperatura, esse valor não é superior a 20%. Inclusive a menor variação ao longo do tempo (30h) foi observada em 30°C, seguida de T= 40°C. Da figura 32, nota-se que em pH 7,5 a temperatura afeta a atividade da GLUDH, observando-se as oscilações mais intensas das atividades nos intervalos de tempo entre 0 e 10h.

A 45°C, houve a maior queda de atividade no período entre 0 e 10h, (26,8%), com um leve aumento entre 10 e 24h (15,42%), mantendo-se constante no período seguinte.

4.3.7. Determinação das constantes cinéticas para GLUDH com relação ao NADPH.

Os volumes de NADPH e suas respectivas concentrações foram variados ao longo do experimento de acordo com o indicado no item 3.3.4.7.. Na figura 35, apresenta-se a variação na atividade da GLUDH em função da concentração inicial de NADPH.

Figura 35: Atividade da GLUDH nas diferentes concentrações de NADPH.

Para calcular o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ da GLUDH frente o NADPH, utilizou-se o método de Lineweaver-Burk (Figura 39).

Figura 36: Determinação das constantes cinéticas da GLUDH, empregando o método de Lineweaver-Burk, sendo a equação da reta: $1/v = 0,268(1/s) + 5,2$ ($r = 0,997$).

Os valores obtidos para as constantes foram: $K_m = 0,052 \text{ mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,192 \text{ mg/mLxs}$.

A determinação das constantes cinéticas em relação ao substrato amônia e 2-oxoglutarato é dificultada pelo fato deles terem sido usados em altas concentrações, para favorecer a reação inversa da GLUDH, ou seja, a oxidação do NADPH em NADP (BERGMEYER, 1984). Em relação ao NADPH foi possível determinar os valores das

constantes cinéticas. Apesar da alta concentração, o cofator ainda se encontra em quantidade catalítica.

Tabela 16: Determinação das constantes cinéticas da GLUDH frente ao NADPH

Vol. NADPH (uL)	[NADPH] mg/mL	Atividade (uM/s)	1/[NADPH]	1/Atividade
20	0,02	0,0532	50,0	18,8
30	0,03	0,0724	33,3	13,8
40	0,04	0,0864	25,0	11,6
50	0,05	0,0936	20,0	10,7
80	0,08	0,0917	12,5	10,9

4.4. Caracterização da Glutamato-desidrogenase (GLUDH) quanto ao cofator NADH.

4.4.1. Padronização da atividade enzimática

De acordo com o procedimento descrito no item 3.3.5.1., os testes para determinação da atividade da GLUDH (NADH) foram feitos em quintuplicata.

Figura 37: Consumo de NADH em função do tempo, resultante da redução do 2-oxoglutarato pela GLUDH. A reta de regressão linear é:

$y = -0,0336t + 152,59$ ($r = 0,995$), onde y corresponde às concentrações de NADH, ainda, na forma reduzida.

A atividade da GLUDH frente ao NADH foi de $0,0336 \mu\text{M}$ de NADH consumido/s, isso porque a enzima oxida o cofator levando-o à NAD. O desvio padrão encontrado nos testes em quintuplicata foi de $2,1687 \times 10^{-5} \mu\text{M/s}$ e o coeficiente de variação foi de 8,41%.

4.4.2. Efeito do pH na atividade da GLUDH.

Figura 38: Variação da atividade da GLUDH em diferentes pHs, usando NADH como cofator.

Após a realização dos testes (Item 3.3.5.2.), apenas variando-se o valor do pH em cada reação, observou-se maior atividade da GLUDH frente ao NADH em pH 7,0 ($0,04250 \mu\text{M}$ de NADH formado/s), apresentando comportamento parecido ao da enzima na presença do cofator NADPH.

4.4.3. Efeito da temperatura na atividade da GLUDH.

De acordo com o item 3.3.5.3., estudou-se a influência da temperatura na atividade da GLUDH.

Figura 39: Variação da atividade da GLUDH na presença de NADH em diferentes temperaturas.

Da Figura 39, observa-se que v_{GLUDH} na presença de NADH aumentou linearmente com o aumento da temperatura na faixa entre 30 e 45°C. Este comportamento foi muito parecido ao obtido com a mesma enzima em presença de NADPH (Fig. 29).

Tabela 17: Atividade segundo a variação de temperatura

<i>Temperatura °C</i>	<i>Atividade (mg/mL*s)</i>
30	0,0264
35	0,0424
40	0,0584
45	0,0744

Foi adotada como padrão a temperatura de 30°C, conforme já salientado. A energia de ativação e o Q_{10} , calculados como indicado anteriormente são, respectivamente, 66,0kJ/mol e 2,35.

4.4.4. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.

Os testes efetuados nessa etapa utilizaram os mesmos parâmetros estabelecidos no Item 4.3.5.4., combinando-se diferentes pHs e temperaturas.

Figura 40: Variação da atividade da GLUDH na presença de NADH em diferentes temperaturas [(●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C] combinadas com diferentes valores de pH.

A partir da figura 40, nota-se que a maior atividade da enzima ocorre em pH 7,0, exceto para a temperatura de 30°C. Analisando-se os coeficientes de variação (Tabela 18), quer variando a temperatura e mantendo o pH fixo ou quer variando o pH e mantendo a temperatura fixa, nota-se que o pH tem efeito maior que a temperatura. O CV para a variação do pH ficou entre 65,2 e 76,2%, enquanto que para a variação da temperatura situa-se na faixa entre 24,6 e 40,1%.

Tabela 18: Atividade da GLUDH em relação ao pH e à temperatura, usando o NADH como cofator

	30°C	35°C	40°C	45°C			
pH	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade	Média	DP	CV
7,0	0,163	0,446	0,462	0,517	0,397	0,159	40%
7,5	0,035	0,038	0,062	0,072	0,052	0,018	36%
8,0	0,286	0,215	0,178	0,309	0,247	0,061	25%
8,5	0,330	0,287	0,276	0,142	0,259	0,082	32%
Média	0,207	0,247	0,245	0,260			
DP	0,133	0,170	0,169	0,198			
CV	65%	69%	69%	76%			

Os dados mostram semelhança de comportamento entre as atividades da GLUDH, avaliadas frente ao NADPH e NADH.

4.4.5. Estabilidade da GLUDH frente ao pH.

Figura 41: Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 2h a 30°C

Figura 42: Estabilidade da GLUDH frente ao pH [(●)7,0; (○)7,5; (■)8,0 e (□)8,5] por um período de 30h a 30°C.

Depois de realizados os testes de acordo com o item 3.3.5.5, pode-se inferir da tabela 14A do anexo que a atividade enzimática é menos influenciada quando a GLUDH é submetida à reação em pH 7,0 (CV = 17%). Porém no período entre 24 e 30h observa-se uma diminuição acentuada da atividade da ordem de 41% devido ao pH.

4.4.6. Estabilidade da GLUDH frente à temperatura.

Figura 43: Estabilidade da GLUDH frente às temperaturas (●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C por um período de 2h, em pH 7,5.

Figura 44: Estabilidade da GLUDH frente às temperaturas (●)30°C, (○) 35°C, (■) 40°C e (□) 45°C por um período de 30h, em pH 7,5.

Após os testes realizados de acordo com o item 3.3.5.6., nota-se que a maior variação da atividade da enzima em todas as temperaturas se dá no período entre 10 e 24h, onde o coeficiente de variação oscila entre 2 e 47% (Tabela 13A do anexo). A atividade da enzima diminui mais quando submetida a 45°C, já que no intervalo entre 10 e 24h, a atividade teve uma queda de 50%, seguida de queda de 23% no período seguinte. À temperatura de 40°C, observa-se o menor CV (12%) (Tabela 12A do anexo).

4.4.7. Determinação das constantes cinéticas com relação ao NADH.

Não foi possível determinar as constantes cinéticas em relação a nenhum substrato e ao cofator seguindo o procedimento do item 3.3.5.7.. BERGMEYER (1984) justifica esse fato, dizendo que as constantes são difíceis de obter devido à utilização da reação inversa da GLUDH.

4.5. Imobilização de cofatores (NAD e NADP)

Os testes com imobilização de cofatores foram realizados obedecendo ao procedimento do item 3.3.6.. Os resultados encontram-se na tabela 19, após os cálculos feitos utilizando-se a equação 6.

Tabela 19: Eficiência da imobilização de cofatores (NADP e NAD), expressa em porcentagem, por resinas de troca iônica em diferentes pHs.

Resina	Cofator	pH			
		7,0	7,5	8,0	8,5
1x2-100	NADP	99,8	99,1	100	100
	NAD	98,7	98,2	97,2	100
1x4-100	NADP	99,3	98,6	98,7	100
	NAD	98,4	97,2	97,3	100
1x8-100	NADP	99,8	98,7	99,6	100
	NAD	96,8	95,5	96,6	98,0

A eficiência da imobilização dos cofatores (NAD e NADP) nas condições empregadas, foi sempre superior a 95%, independentemente do pH da solução na faixa de 7,0-8,5. Este resultado é importante porque o pH reacional para as enzimas G6PDH e GLUDH situa-se dentro desta mesma faixa. Sendo assim, a possível dessorção do cofator é praticamente eliminada.

No trabalho de OBÓN e colaboradores (1996), foi utilizado um polímero de alto peso molecular de polietilenamina (PEI) para imobilizar o cofator juntamente com diferentes soluções iônicas. A porcentagem de imobilização conseguida foi de 83%. Segundo LIU e colaboradores (2009), a imobilização de cofatores em nanopartículas de sílica foi da ordem de 0,4g de cofator /g de partícula, ou seja, uma eficiência de imobilização de 60%. Portanto, o emprego de resinas de troca iônica para adsorver os cofatores, constitui-se em excelente método de imobilização.

4.6. Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma solúvel em regime descontínuo.

A regeneração NADP/NADPH foi feita através do uso simultâneo das enzimas G6PDH e GLUDH, segundo descrito no item 3.3.7.1. Os dados são apresentados nas Tabelas 20 e 21 e nas Figuras 45 e 46.

Tabela 20: Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 1mL. O meio reacional foi composto por 290µL de tampão tris (0,05M), 500µL de G6P (50mM), 40µL de NADP (500µM), 100µL de NH_4^+ (3,2M) e 70 µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Parâmetros	Tempo (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
[G6P] _{inicial} (mg)	7,70	-	-	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	3,04	3,20	3,07	3,30	2,93	2,86
Conversão (%)	-	60,6	58,5	60,2	57,2	62,0	62,9
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)*	55,3	-	-	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)*	-	24,9	25,3	17,0	13,4	14,7	7,8
Conversão (%)	-	55,0	54,3	69,2	75,7	73,4	85,4
[NADP] _{inicial} (M) x 10 ⁻⁵	2,53	-	-	-	-	-	-
[NADP] _{final} (M) x 10 ⁻⁵	-	1,34	1,27	1,21	1,05	1,25	1,20
Conversão (%)	-	47,0	50,0	52,1	58,5	50,6	52,6

Pela tabela 20 e Figura 45, observa-se que a conversão da amônia e da G6P após 60min de reação foi de 85,4% e 62,9%. No caso dos cofatores, a quantidade de NADP medida nos diversos períodos, permaneceu constante e praticamente a metade da quantidade acrescentada inicialmente. Este resultado indica que o ciclo NADP/NADPH se manteve durante a reação, catalisada pelas enzimas G6PDH e GLUDH.

Figura 45: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 60min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Tabela 21: Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900μL de tampão tris (0,05M), 5000μL de G6P (50mM), 400μL de NADP (500μM), 1000μL de NH_4^+ (3,2M) e 700 μL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Parâmetros	Tempo (min)				
	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	20,0	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	5,66	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	2,25	2,07	2,17	2,31
Conversão (%)	-	88,7	89,6	89,1	88,4
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	276	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	2,68	4,53	4,44	4,16
Conversão (%)	-	99,0	98,4	98,4	98,5
[NADP] _{inicial} (M) x10 ⁻⁵	7,72	-	-	-	-
[NADP] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	1,76	-	-	-	-
[NADP] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	3,17	2,93	3,01	2,82
Conversão (%)	72,6	60,2	61,9	61,9	64,3
[NADPH] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,25	-	-	-	-
[NADPH] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	2,44	2,50	2,37	2,40

Figura 46: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Com a ampliação de escala (item 3.3.7.2), observa-se pelos dados da Tabela 21 e da Figura 46 que a conversão da amônia e da G6P foi de 98,5% e 88,4%, respectivamente. Supera, portanto, as conversões obtidas em escala dez vezes menor. Observa-se também que o ciclo NADP/NADPH foi mantido.

Posteriormente, realizou-se outro teste nos moldes do item 3.3.7.1., porém com temperatura de 40°C, cujos resultados são semelhantes aos experimentos realizados à temperatura de 30°C (Tabela 22 e Figura 47).

Tabela 22: Variação das concentrações de G6P, amônia e NADP ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 40°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NADP (500µM), 1000µL de NH_4^+ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Parâmetros	Tempo (min)				
	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	32,3	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	12,9	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	2,55	2,34	2,52	2,42
Conversão (%)	60,0	92,1	92,7	92,2	92,5
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	251	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	2,31	10,6	3,70	4,16
Conversão (%)	-	99,1	95,7	98,5	98,3
[NADP] _{inicial} (M) x10 ⁻⁵	7,72	-	-	-	-
[NADP] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,26	-	-	-	-
[NADP] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	2,48	3,00	3,46	3,63
Conversão (%)	70,7	67,9	61,1	55,4	53,0
[NADPH] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,37	-	-	-	-
[NADPH] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	5,42	4,79	4,16	4,08

Figura 47: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 40°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Em que pese as diferenças nas condições experimentais, o alto desempenho observado para a interconversão NADP/NADPH, usando as enzimas G6PDH e GLUDH, também foi obtido por outros autores. OBÓN et al (1996) obtiveram conversão total da glicose usando o sistema bienzimático glicose desidrogenase/glutamato desidrogenase e HUMMEL e KULA (1989) afirmaram que a regeneração de NADP/NADPH pela interconversão através do binômio G6PDH e GLUDH em processo descontínuo vem sendo conduzido de forma satisfatória em escala laboratorial, com possibilidade de scale-up.

Após estabelecidos os parâmetros para a interconversão do NADP em NADPH, utilizou-se as mesmas condições de reação para a interconversão de NAD em NADH. Os resultados são demonstrados nas tabelas 23 e 24 e nas figuras 48 e 49.

Tabela 23: Variação das concentrações de G6P, amônia e NAD ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), 400µL de NAD (500µM), 1000µL de NH_4^+ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Parâmetros	Tempo (min)				
	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	34,8	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	7,39	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	2,42	2,70	2,60	2,56
Conversão (%)	78,8	93,0	92,2	92,5	92,6
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	274	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	4,81	4,54	5,46	6,2
Conversão (%)	-	98,2	98,3	98,0	97,7
[NAD] _{inicial} (M) x10 ⁻⁵	6,40	-	-	-	-
[NAD] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,53	-	-	-	-
[NAD] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	2,41	2,65	2,78	3,58
Conversão (%)	60,5	62,3	58,6	56,6	44,1
[NADH] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,18	-	-	-	-
[NADH] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	5,05	4,55	4,31	4,04

Figura 48: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (○) e G6P (■)).

Tabela 24: Variação das concentrações de G6P, amônia e NAD ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 40°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900μL de tampão tris (0,05M), 5000μL de G6P (50mM), 400μL de NAD (500μM), 1000μL de NH_4^+ (3,2M) e 700μL de 2-oxoglutarato (0,2M).

Parâmetros	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	36,8	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	6,87	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	2,40	2,32	2,96	2,82
Conversão (%)	81,3	93,5	93,7	91,2	92,3
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	274	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	15,1	16,8	15,7	14,6
Conversão (%)	-	94,5	93,9	94,2	94,7
[NAD] _{inicial} (M) x10 ⁻⁵	6,4	-	-	-	-
[NAD] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,13	-	-	-	-
[NAD] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	3,48	2,87	3,23	3,08
Conversão (%)	66,7	45,6	55,1	49,5	51,9
[NADH] _{4min} (M) x10 ⁻⁵	2,95	-	-	-	-
[NADH] _{final} (M) x10 ⁻⁵	-	3,68	3,64	3,19	3,17

Figura 49: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH, a 40°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Comparando-se o rendimento da reação entre os dois cofatores (NAD/NADP), pode-se afirmar que nas duas reações foram mantidos os ciclos de interconversões, com quantidades praticamente iguais de NAD e NADH quando a reação é realizada a 40°C, visto que na reação com o NAD, houve uma queda de apenas 3,74% na conversão da amônia.

4.7. Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma imobilizada em regime descontínuo.

A regeneração NADP/NADPH/NAD/NADH foi feita através do uso simultâneo das enzimas G6PDH e GLUDH, segundo descrito no item 3.3.7.3 e 3.3.8.3. Os dados são apresentados nas e nas Figuras 50 e 51.

Figura 50: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), a 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Figura 51: Conversão dos substratos amônia e G6P ao longo de 90min de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD), a 40°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Observando-se as figuras 50 e 51, nota-se que houve uma conversão satisfatória de ambos os substratos, tanto para o cofator NADP quanto para o cofator NAD, apesar

da conversão, utilizando-se os cofatores solúveis, ser 20% maior para a G6P. Os dados são descritos nas tabelas 25 e 26.

Tabela 25: Variação das concentrações de G6P e amônia ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), NADP imobilizado, 1000µL de NH_4^+ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

	Tempo (min)				
Parâmetros	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	76,2	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	33,6	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	18,0	15,9	15,1	16,3
Conversão (%)	55,9	76,4	79,1	80,2	78,6
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	84,7	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	14,7	14,5	13,8	0,00
Conversão (%)	-	82,6	82,9	83,6	100,0

Tabela 26: Variação das concentrações de G6P e amônia ao longo do tempo, devido à ação simultânea da G6PDH e da GLUDH. As condições de ensaio foram: 30°C, pH 7,3, volume de reação: 10mL. O meio reacional foi composto por 2900µL de tampão tris (0,05M), 5000µL de G6P (50mM), NAD imobilizado, 1000µL de NH_4^+ (3,2M) e 700µL de 2-oxoglutarato (0,2M).

	Tempo (min)				
Parâmetros	4	10	30	60	90
[G6P] _{inicial} (mg)	66,4	-	-	-	-
[G6P] _{4min} (mg)	30,1	-	-	-	-
[G6P] _{final} (mg)	-	13,8	13,4	13,4	13,9
Conversão (%)	54,6	79,2	79,7	79,8	79,0
[NH ₄ ⁺] _{inicial} (mg)	83,0	-	-	-	-
[NH ₄ ⁺] _{final} (mg)	-	15,8	15,4	15,7	15,8
Conversão (%)	-	80,9	81,1	81,1	80,9

4.8. Regeneração do NADP/NADPH na forma solúvel em regime contínuo.

Para a regeneração dos cofatores, utilizando-se enzimas acopladas, procedeu-se conforme descrito no item 3.3.9., cujos resultados são apresentados na figura 52.

Figura 52: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), com fluxo de alimentação de 10mL/h, a 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Da Figura 52 observa-se que o processo contínuo procedeu em regime transiente e que a partir de 9h a conversão da G6P e da amônia, praticamente, cessou. Levando em conta os dados apresentados na Tabela 16 (anexo), obteve-se uma conversão média de 17,2%.

Porém, fixando a atenção no intervalo $0 < t < 9h$, observa-se que as quantidades de G6P e amônia oscilaram fortemente, indicando que, neste intervalo de tempo, o sistema bienzimático e o reciclo NADP/NADPH ocorreram. Em 0,5h de processo toda a G6P foi consumida associada ao acúmulo de NADPH no reator. Uma vez a concentração de NADPH ter alcançado um determinado valor, a amônia passou a ser consumida com a conseqüente regeneração do NADP. Provavelmente, após $t=9h$, as formas oxi-red do cofator alcançaram o equilíbrio, o qual por ser muito mais rápido que o tempo de residência dos substratos dentro do reator acabou por tornar os consumos de G6P e amônia desprezíveis.

Se o equilíbrio imaginado para os cofatores fosse real, então o seu rompimento deveria melhorar o desempenho do processo. Uma maneira de rompê-lo seria adicionar o G6P e a amônia (juntamente com o 2-oxoglutarato) de modo alternado. Para tanto,

procedeu-se como segue: alimentou-se o reator por 1h com uma solução de G6P seguindo-se a adição de amônia por 2h até completar 10h de processo. A seguir passou-se a alimentar o reator com G6P, amônia e 2-oxoglutarato até $t=22h$. A partir desse momento até completar 30h de processo as soluções de substratos passaram a ser administradas alternadamente. O resultado deste ensaio está mostrado na Figura 53.

Figura 53: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos com fluxo de 10mL/h, a 30°C e pH 7,3 (Amônia ($\square$) e G6P ($\blacksquare$)).

Comparando as Figuras 52 e 53 observa-se nitidamente que a alternância da adição dos substratos, levou a um melhor desempenho do processo. Porém, o processo contínuo transcorreu em regime transiente (Fig. 53). Como nas primeiras 10h e nas últimas 7h de ensaio, as soluções de substratos foram administradas alternadamente e por 11h os substratos foram adicionados simultaneamente, decidiu-se calcular as percentagens de consumo de G6P e de amônia nos intervalos indicados. Os valores são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27: Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 53.

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-10	64,1	79,4
11-22	14,8	14,0
23-30	35,0	52,6

Pela Tabela 27, concluiu-se que o processo bienzimático (G6PDH/GLUDH) com reciclo do cofator (NADP/NADPH) deve ser executado com alimentação alternada dos substratos.

Repetiu-se o ensaio anterior, porém aumentando-se a temperatura a 40°C, com o objetivo de verificar algum efeito acelerador na velocidade do processo. Os dados são mostrados na Figura 54 e as percentagens de conversão na Tabela 28.

Figura 54: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos com fluxo de 10mL/h, a 40°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Analisando-se o gráfico, nota-se que o aumento da temperatura não favoreceu o aumento da atividade enzimática e consequentemente não favoreceu o consumo dos substratos. No primeiro período, por exemplo, a conversão caiu 27% para o G6P e 37% para a amônia, em relação ao experimento realizado a 30°C. Provavelmente a ineficiência do processo pôde ser atribuída à perturbação da atividade da G6PDH com a elevação da temperatura. Lembra-se que a atividade catalítica da G6PDH diminuiu com o aumento da temperatura (item 4.1.6.)

Tabela 28: Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 54.

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-12	46,8	50,4
13-24	19,6	14,0
25-30	0,00	27,4

Para o próximo teste, aumentou-se o fluxo de alimentação no reator para 20mL/h e a temperatura utilizada foi de 30°C. O resultado é demonstrado na figura 55 e as percentagens de conversão de G6P e amônia são apresentadas na Tabela 29.

Figura 55: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

O aumento no fluxo de alimentação não favoreceu a conversão dos substratos. O período demonstrado no gráfico entre 13 e 22h para a conversão de G6P, apesar de assemelhar-se com um estado estacionário, a conversão do substrato foi zero nesse período. No caso da amônia, o período entre 17 e 25h teve uma variação de conversão de 33%. Comparando-se com o fluxo de 10mL/h, pode-se dizer que a conversão das G6P caiu 18% no primeiro período enquanto a amônia caiu 81%.

Tabela 29: Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig.55

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-7	52,6	15,0
8-23	0,00	23,7
24-30	40,7	35,1

No procedimento seguinte, mantiveram-se o fluxo de alimentação, a temperatura e o pH, trocando-se apenas o cofator utilizado, o NAD. O resultado é apresentado na

figura 56 e as percentagens de conversão de G6P e amônia são apresentadas na Tabela 30.

Figura 56: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Os resultados apresentados com o uso do NAD não diferenciam muito dos resultados quando o outro cofator é utilizado nas mesmas condições. Apenas no caso da conversão da amônia que no 1º período foi observado um aumento de 61% na conversão. No período entre 22 e 28h houve apenas uma diferença máxima de 12% entre as taxas de conversão da G6P, o que poderia caracterizar um período de estado estacionário.

Tabela 30: Média da conversão dos substratos em 30h de reação cujos perfis de variação são apresentados na Fig.56.

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-9	65,0	38,2
10-21	17,7	26,1
22-30	39,5	18,2

4.9. Regeneração do NADP/NADPH/NAD/NADH na forma imobilizada em regime contínuo.

O procedimento utilizado encontra-se descrito no item 3.10. A reação foi feita a 30°C, pH 7,3 e vazão de alimentação de 20mL/h. O resultado utilizando-se o cofator

NADP encontra-se na figura 57 e os percentuais de conversão de G6P e amônia são apresentados na Tabela 31.

Figura 57: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NADP imobilizado), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Tabela 31: Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 57.

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-6	52,6	15,0
7-21	0,00	23,7
22-30	40,7	35,1

Comparando-se com o experimento realizado nas mesmas condições (Fig.55 e Tabela 29), porém com o cofator solúvel, praticamente não há diferença entre eles.

Repetiu-se o teste anterior, substituindo o NADP pelo NAD imobilizado. Os resultados são apresentados na Figura 58 e as percentagens de conversão da G6P e da amônia na Tabela 32.

Figura 58: Concentração dos substratos amônia e G6P ao longo de 30h de reação acoplada da G6PDH e da GLUDH (NAD imobilizado), alternando-se a alimentação com substratos a um fluxo de 20mL/h, 30°C e pH 7,3 (Amônia (□) e G6P (■)).

Tabela 32: Média da conversão dos substratos em 30h de reação, cujos perfis de variação são mostrados na Fig. 58.

Período (h)	G6P (%)	Amônia (%)
1-7	52,14	16,26
8-23	7,18	3,38
24-30	74,89	10,50

Comparando os dados da conversão de G6P e amônia entre os ensaios efetuados com os cofatores imobilizados (Tabelas 31 e 32), observa-se que a conversão da G6P foi maior, quando se utilizou o NAD imobilizado, porém a da amônia diminuiu a partir de $t=8h$.

Ficou claro que a operação contínua em regime transiente do sistema bienzimático (G6PDH/GLUDH) com o reciclo do cofator (NADP/NADPH/NAD/NADH) solúvel ou imobilizado, deve ser conduzida com a adição alternada dos substratos. Associando a esse dado, a propriedade que as oxidoredutases possuem de catalisar reversivelmente a conversão das formas oxidada e reduzida do cofator resultante de um mesmo substrato, ou substratos com grupos funcionais complementares (acetona/álcool, amina/amida, álcool/aldeído, etc), pode-se projetar para a continuidade do trabalho, o uso de uma mesma oxidoredutase em reator contínuo com membrana, com adição alternada das formas oxidada e reduzida de uma

dada substância. Por exemplo, ZUCCA et al, 2009, utilizaram a enzima álcool desidrogenase (ADH) dependente de NADH para a produção de álcool cinamídico a partir do cinamaldeído, produtos usados como aromatizantes. Para a reciclagem do cofator, de NAD para NADH, o autor acrescentou o substrato 2-propanol ou etanol, que foi convertido em acetona ou acetaldeído, respectivamente.

5. CONCLUSÕES.

A partir dos resultados apresentados, concluiu-se que os parâmetros para a catálise com glicose-6-fosfato desidrogenase para os cofatores NAD e NADP eram 30°C e pH 7,5, condições nas quais a atividade enzimática foi maior e sua estrutura manteve-se estável. As constantes cinéticas foram iguais a: $K_m = 15,3 \mu\text{M}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,11 \mu\text{M/s}$, para o NADP e $K_m = 12,4 \mu\text{M}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,04 \mu\text{M/s}$. Já para a glutamato desidrogenase, tanto para NADPH quanto para NADH, as melhores condições para reação foram pH 8,0 e 40°C, parâmetros em que a enzima manteve-se estável e teve boa atividade. As constantes cinéticas da GLUDH encontradas, apenas, para o cofator NADPH foram: $K_m = 0,052\text{mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,192 \text{ mg/mLxs}$. No caso da imobilização dos cofatores NADP e NAD, em todos os pHs testados a resina apresentou boa taxa de eficiência de imobilização (próximo a 100%), sendo o pH utilizado adaptável às condições de uma determinada reação enzimática.

Para a reação descontínua acoplada, cujo pH foi mantido em 7,3 e a temperatura em 30°C, os dados obtidos para um tempo de reação variado entre 10 e 90min, mostraram o estabelecimento da condição cíclica NADP/NADPH, com a concomitante conversão dos substratos amônia e G6P, praticamente em sua totalidade.

No caso da reação contínua, não foi possível chegar ao estado estacionário, porém chegou-se à conclusão que a alimentação alternada de substratos foi o melhor meio para aumentar a atividade do sistema. O ciclo NADP/NADPH e NAD/NADH foi mantido.

Para a melhoria do sistema sugere-se a utilização de um tempo de residência maior e o emprego de outras enzimas para o sistema bienzimático ou o uso de uma mesma oxidorreductase em presença de substratos oxidados e reduzidos pertencentes a funções químicas complementares (cetona/álcool, amina, amida, etc).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFANI, F., CANTARELLA, M., CANTARELLA, L., VITOLO, M. Biocatalyst operational stability: a review of investigation methods in ultrafiltration membrane reactors. **Farm.Quím.**, v.32, n.4, p.17-23, 1999.

BERGMEYER, H.U., Ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984, v.2, p. 539.

BETANCOR, L., BERNE, C., LUCKARIFT, H.R., SPAIN, J.C.; Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system; *Chem Comm*, v.23, p. 3640-3642, 2006.

BOLIVAR, J.M.; MARTIN, J.R.; MATEO, C.; CAVA, F.; BERENGUER, J.; VEGA, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.; Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.58, p.158-163, 2009.

BYHLIN, H., JONSSON, A.S. Influence of adsorption and concentration polarization on membrane performance during ultrafiltration of a non-ionic surfactant. **Desalination**, v.151, p.21-31, 2002.

CURCIO, S., CALABRÓ, V., IORIO, G. Monitoring and control of TMP and feed flow rate pulsatile operations during ultrafiltration in a membrane module. **Desalination**, v.146, p.217-222, 2002.

GARRETT, R.H., GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. New York, USA, Saunders College Publishing, 1995. p. 1100.

GIORNO, L., DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol.** v.18, n.8, p.339-349, 2000.

GODFREY, T., WEST, S. **Industrial Enzymology**. 2nd Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, 1996. p. 609.

HOLOWNIA, A.T.; NOWORYTA, A.; Peptides removing in an enzymatic membrane bioreactor. **Dessalination**, v.221, p.543-551, 2008.

HUMMEL, W.; KULA, M.R.; Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. **European Journal of Biochemistry**, v.184, p.1-13, 1989.

ILLANES, A. **Biotecnologia de Enzimas**. Valparaiso, Chile, Ediciones Universitarias de la Universidad Católica de Valparaiso, 1994. p.320.

KARASYOVA, E.I., KURCHENKO, V.P., METELITZA, D.I.; Flavonoids: Efficient Protectors of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Ultrasonic Cavitation-Induced Inactivation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.43, p. 158-168, 2007.

KIELING, D.D., FURIGO-JÚNIOR, A. **Enzimas: aspectos gerais**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KIM, Y.H.; YOO, Y.J.; Regeneration of nicotinamide cofactor using a mediator-free eletrochemical method with a tin oxide electrode. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, p.129-134, 2009.

KULA, M.R., KRAGL, U.; Dehydrogenases in synthesis of chiral compounds. In: RAMESH, N.P., Editor. **Stereoselective Biocatalysis**. New York, USA, Marcel Dekker, p.839–866, 2000.

LEE, D. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T.; Continuous H₂ production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v.100, p.690-695, 2009.

LEE, L.G.; WHITESIDES, G.M. Enzyme-catalyzed organic synthesis: A comparison of strategies for in situ regeneration of NAD from NADH. **Journal of American Chemical Society**, v.107, p.6999-7008, 1985.

LIU, W., WANG, P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v.25, p.369-384, 2007.

LIU, W.; ZHANG, S. WANG, P. Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with in situ cofactor regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 102-107, 2009.

MANTRI, M.; JAMBHRUNKAR, S. Oxidoreductase enzyme: The hope for Biotransformation. **Pharma Times**, v. 41, n° 2, p.13-15, 2009.

MASON, P.J.; BAUTISTA, J.M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood Reviews**, v.21, p. 267-283, 2007.

MESSING, R. A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. New York, USA, Academic Press, 1975. p.175.

NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3rd Ed., San Diego, Academic Press, 1993.

NEVES, L.C.M. **Emprego de Reator com Membrana na Obtenção da Frutose e Ácido Glicônico a partir da Sacarose**. São Paulo, 2006. 176 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

OBÓN, J.M.; ALMAGRO M.J.; MANJÓN, A. IBORRA, J.L.; Continuous retention of native NADP(H) in na enzyme membrane reactor for gluconate and glutamate production. **Journal of Biotechnology**, v.50, p.27-36, 1996.

PERTERSON, E.P.; SMITH, T.J. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. **Structure**, v.7, p. 769-782, 1999.

PRAZERES, D.M.F., CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme Microb. Technology**, v.16, p.738-749, 1994.

RIBEIRO, M.Z. **Extração de Glucose 6-fosfatodesidrogenase em Sistemas de Duas Fases Aquosas**. São Paulo, 2001. 138p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, M.Z.; SILVA, D.P.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; PESSOA-JR., A.; Partial Purification of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by Aqueous Two-Phase Poly (ethyleneglycol)/Phosphate System.; **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 78-83, 2007.

ROCHA-FILHO, J.A., VITOLO, M. **Enzimas no Contexto da Síntese Orgânica**. São Paulo, Ed. Dos Autores, 1998. 43p.

SMITH, T.J., STANLEY, C.A. Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare, **Trends in Biochemical Sciences**, v.33, nº 11, p. 557-564, 2008.

SHIN, H.S., KANG, S.T. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. **Water Res.**, v.37, n.1, p.121-127, 2003.

SILVA, R.T., IGLESIAS, M.A.C., MEDEIROS, I.D., BEZERRA, I.M., MEDEIROS, T.M.D.; Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em adultos. **News Lab**, v. 79, p.96-102, 2006.

TOMOTANI, E.J. **Imobilização da Invertase em Resina de Troca Iônica (tipo Dowex®): Seu Uso na Modificação da Sacarose**. São Paulo, 2002, p.29-38 e p.55. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciência Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TOMOTANI, E.J., VITOLO, M. Screening of DOWEX anion exchange resins for invertase immobilization. **Appl.Biochem.Biotechnol.**, v.113-116, p.145-159, 2004.

TOMOTANI, E.J., DAS NEVES, L.C.M., VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in membrane bioreactor. **Appl.Biochem.Biotechnol.**, v.121-124, p.149-162, 2005.

TOMOTANI, E.J. **Bioconversão de sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator com Membrana**. São Paulo, 2006. 102p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M.; Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v.41, p.1325-1331, 2006.

TOMOTANI, E.J. Informação Pessoal (2007).

WEST, S. Chemical Biotransformations. In: **Industrial Enzymology**, GODFREY, T. and WEST, S., Eds. 2nd Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, 609p., 1996.

ZUCCA, P.; LITTARRU, M.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; Cog]factor Recycling for Selective Enzymatic Biotransformation of Cinnamaldehyde to Cinnamyl Alcohol. **Bioscience, Biochemistry and Biotechnology**, v.73, nº 5, p. 1224-1226, 2009.

ANEXO I – Formulação de reagentes e tabelas

1. Preparação dos reagentes de Somogyi

- Solução Alcalina (Somogyi I)

Dissolveram-se os seguintes sais em 1000 mL de água destilada:

NaHCO₃.....20,0g

NaKC₂H₄O₆.....15,0g

Na₂CO₃.....30,0g

Na₂SO₄.....180,0g

- Solução alcalino-cúprica (Somogyi II)

Dissolveu-se 46,0g de Na₂SO₄ em 100mL de uma solução de CuSO₄.5H₂O de 40g/L e completou-se o volume da dissolução a 200mL.

- Solução arseno-molibdica (Somogyi III)

Dissolveu-se 25g de molibdato de amônio em 400mL de água destilada e 3g de arseniato de sódio em 25mL de água destilada. Adicionou-se, a seguir, o ácido sulfúrico à solução de molibdato de amônio e, a seguir, juntou-se à solução de arseniato. Completou-se o volume da solução final à 475mL.

4.3.1.2. Preparação das soluções de glicose:

Dissolveu-se 0,1g de glicose P.A. em 100mL de água destilada. Tomou-se 20 mL da solução e completou-se essa alíquota com 100mL de água destilada, obtendo-se uma solução final com concentração de 0,2mg/mL.

4.3.1.3 Estabelecimento da curva-padrão:

Em tubos de folin-wu colocou-se os volumes indicados pela Tabela 1, sendo a mistura reativa constituída de 4 partes de Somogyi I e 1 parte de Somogyi II). A seguir, colocou-se os tubos em banho fervente por 10 min, retirando-os em seguida e os alocando em banho de gelo.. Após o resfriamento, adicionou-se 2,0 mL de Somogyi III em cada tubo, agitando-os para remover os gases formados pela reação. Homogeneizaram-se os tubos e a cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro a 540nm, após repouso de 20 min. O procedimento foi repetido mais quatro vezes.

Tabela 1A: Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.

Tubo (nº)	Solução de glicose (mL)	H ₂ O (mL)	Mistura Reativa (mL)	Somogyi III (mL)
Branco	-	1,0	1,0	2,0
1	0,2	0,8	1,0	2,0
2	0,4	0,6	1,0	2,0
3	0,6	0,4	1,0	2,0
4	0,8	0,2	1,0	2,0
5	1,0	-	1,0	2,0

Tabela 2A: Variação da atividade da G6PDH (NADP) por 30h à diferentes temperaturas em pH 7,5

Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)				Média	DP	CV
	30°C	35°C	40°C	45°C			
0,00	0,0416	0,0222	0,0384	0,0266	0,0322	0,0093	0,2881
0,25	0,0469	0,0213	0,0342	0,0240	0,0316	0,0116	0,3676
0,50	0,0440	0,0197	0,0326	0,0160	0,0281	0,0128	0,4552
0,75	0,0461	0,0182	0,0318	0,0112	0,0268	0,0154	0,5754
1,00	0,0545	0,0239	0,0309	0,0060	0,0288	0,0201	0,6964
1,25	0,0452	0,0264	0,0298	0,0039	0,0263	0,0170	0,6471
1,50	0,0467	0,0211	0,0288	0,0013	0,0245	0,0188	0,7697
1,75	0,0452	0,0227	0,0284	0,0026	0,0247	0,0176	0,7097
2,00	0,0473	0,0223	0,0254	0,0030	0,0245	0,0182	0,7416
4,00	0,0419	0,0199	0,0210	0,0006	0,0208	0,0169	0,8100
6,00	0,0413	0,0235	0,0182	0,0013	0,0211	0,0165	0,7806
8,00	0,0414	0,0231	0,0105	0,0000	0,0188	0,0178	0,9499
10,00	0,0403	0,0248	0,0169	0,0000	0,0205	0,0168	0,8181
24,00	0,0390	0,00063	0,0002	0,0000	0,0100	0,0194	1,9459
30,00	0,0390	0,0018	0,0005	0,0000	0,0103	0,0191	1,8530
Média	0,0440	0,0194	0,0232	0,0064			
DP	0,0041	0,0077	0,0118	0,0089			
CV	0,0925	0,3953	0,5102	1,3877			

Tabela 3A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática

Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
0,00	0,0416	0,0222	0,0384	0,0266
0,25	0,0469	0,0213	0,0342	0,0240
0,50	0,0440	0,0197	0,0326	0,0160
0,75	0,0461	0,0182	0,0318	0,0112
1,00	0,0545	0,0239	0,0309	0,0060
1,25	0,0452	0,0264	0,0298	0,0039
1,50	0,0467	0,0211	0,0288	0,0013
1,75	0,0452	0,0227	0,0284	0,0026
2,00	0,0473	0,0223	0,0254	0,0030
4,00	0,0419	0,0199	0,0210	0,0006
6,00	0,0413	0,0235	0,0182	0,0013
8,00	0,0414	0,0231	0,0105	0,0000
10,00	0,0403	0,0248	0,0169	0,0000
Média	0,0448	0,0222	0,0267	0,0074
DP	0,0038	0,0022	0,0079	0,0092
CV	0,0849	0,1002	0,2969	1,2422
24,00	0,0390	0,00063	0,0002	0,0000
Média	0,0397	0,0127	0,0085	0,0000
DP	0,0009	0,0171	0,0118	0,0000
CV	0,0232	1,3441	1,3844	0,0000
30,00	0,0390	0,0018	0,0005	0,0000
Média	0,0390	0,0012	0,0003	0,0000
DP	0,0000	0,0008	0,0002	0,0000
CV	0,0000	0,6809	0,6655	0,0000

Tabela 4A: Variação da atividade da G6PDH (NADP) por 30h em diferentes pHs à 30°C

Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)				Média	DP	CV
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5			
0,00	0,0466	0,0449	0,0311	0,0302	0,0382	0,0088	0,2291
0,25	0,0471	0,0421	0,0282	0,0261	0,0359	0,0103	0,2875
0,50	0,0483	0,0426	0,0272	0,0301	0,0371	0,0100	0,2711
0,75	0,0506	0,0449	0,0250	0,0282	0,0372	0,0125	0,3362
1,00	0,0508	0,0435	0,0284	0,0283	0,0378	0,0113	0,2982
1,25	0,0497	0,0489	0,0301	0,0307	0,0399	0,0109	0,2740
1,50	0,0450	0,0425	0,0262	0,0301	0,0360	0,0092	0,2560
1,75	0,0512	0,0430	0,0328	0,0282	0,0388	0,0103	0,2661
2,00	0,0481	0,0403	0,0293	0,0258	0,0359	0,0102	0,2851
4,00	0,0477	0,0428	0,0199	0,0263	0,0342	0,0132	0,3864
6,00	0,0471	0,0399	0,0256	0,0289	0,0354	0,0099	0,2805
8,00	0,0460	0,0446	0,0239	0,0281	0,0357	0,0113	0,3166
10,00	0,0507	0,0507	0,0285	0,0243	0,0386	0,0141	0,3666
24,00	0,0503	0,0499	0,0328	0,0274	0,0401	0,0118	0,2932
30,00	0,0371	0,0440	0,0275	0,0260	0,0337	0,0085	0,2518
Média	0,0478	0,0443	0,0278	0,0279			
DP	0,0035	0,0032	0,0034	0,0019			
CV	0,0740	0,0727	0,1228	0,0685			

Tabela 5A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática

	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5
Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)	Atividade (uM/s)	Atividade (uM/s)	Atividade (uM/s)
0,00	0,0466	0,0449	0,0311	0,0302
0,25	0,0471	0,0421	0,0282	0,0261
0,50	0,0483	0,0426	0,0272	0,0301
0,75	0,0506	0,0449	0,0250	0,0282
1,00	0,0508	0,0435	0,0284	0,0283
1,25	0,0497	0,0489	0,0301	0,0307
1,50	0,0450	0,0425	0,0262	0,0301
1,75	0,0512	0,0430	0,0328	0,0282
2,00	0,0481	0,0403	0,0293	0,0258
4,00	0,0477	0,0428	0,0199	0,0263
6,00	0,0471	0,0399	0,0256	0,0289
8,00	0,0460	0,0446	0,0239	0,0281
10,00	0,0507	0,0507	0,0285	0,0243
Média	0,0484	0,0439	0,0274	0,0281
DP	0,0020	0,0031	0,0034	0,0020
CV	0,0422	0,0695	0,1227	0,0703
24,00	0,0503	0,0499	0,0328	0,0274
Média	0,0505	0,0503	0,0307	0,0259
DP	0,0003	0,0006	0,0030	0,0022
CV	0,0056	0,0112	0,0992	0,0848
30,00	0,0371	0,0440	0,0275	0,0260
Média	0,0437	0,0470	0,0302	0,0267
DP	0,0093	0,0042	0,0037	0,0010
CV	0,2136	0,0889	0,1243	0,0371

Tabela 6A: Variação da atividade da G6PDH (NAD) por 30h em diferentes pHs à 30°C

Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)				Média	DP	CV
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5			
0,00	0,0192	0,0189	0,0184	0,0180	0,0186	0,00053	0,02854
0,25	0,0180	0,0198	0,0190	0,0216	0,0196	0,00152	0,07771
0,50	0,0213	0,0214	0,0164	0,0158	0,0187	0,00304	0,16242
0,75	0,0179	0,0192	0,0149	0,0158	0,0170	0,00196	0,11546
1,00	0,0168	0,0195	0,0170	0,0173	0,0177	0,00125	0,07084
1,25	0,0181	0,0187	0,0157	0,0154	0,0170	0,00167	0,09827
1,50	0,0181	0,0243	0,0179	0,0164	0,0192	0,00350	0,18252
1,75	0,0184	0,0221	0,0169	0,0154	0,0182	0,00287	0,15791
2,00	0,0199	0,0217	0,0168	0,0191	0,0194	0,00203	0,10488
4,00	0,0232	0,0210	0,0167	0,0184	0,0198	0,00286	0,14435
6,00	0,0181	0,0172	0,0182	0,0166	0,0175	0,00076	0,04355
8,00	0,0248	0,0218	0,0176	0,0163	0,0201	0,00390	0,19387
10,00	0,0164	0,0185	0,0170	0,0219	0,0185	0,00246	0,13354
24,00	0,0323	0,0257	0,0238	0,0084	0,0225	0,01012	0,44895
30,00	0,0284	0,0189	0,0115	0,0107	0,0174	0,00822	0,47338
Média	0,02073	0,02058	0,01719	0,01647			
DP	0,00459	0,00231	0,00255	0,00350			
CV	0,22130	0,11214	0,14845	0,21245			

Tabela 7A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática

Tempo decorrido (h)	Atividade (uM/s)			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5
0,00	0,0192	0,0189	0,0184	0,0180
0,25	0,0180	0,0198	0,0190	0,0216
0,50	0,0213	0,0214	0,0164	0,0158
0,75	0,0179	0,0192	0,0149	0,0158
1,00	0,0168	0,0195	0,0170	0,0173
1,25	0,0181	0,0187	0,0157	0,0154
1,50	0,0181	0,0243	0,0179	0,0164
1,75	0,0184	0,0221	0,0169	0,0154
2,00	0,0199	0,0217	0,0168	0,0191
4,00	0,0232	0,0210	0,0167	0,0184
6,00	0,0181	0,0172	0,0182	0,0166
8,00	0,0248	0,0218	0,0176	0,0163
10,00	0,0164	0,0185	0,0170	0,0219
Média	0,0192	0,0203	0,0171	0,0175
DP	0,0025	0,0019	0,0011	0,0022
CV	0,1284	0,0949	0,0653	0,1252
24,00	0,0323	0,0257	0,0238	0,0084
Média	0,0244	0,0221	0,0204	0,0151
DP	0,0112	0,0051	0,0048	0,0096
CV	0,4617	0,2304	0,2357	0,6314
30,00	0,0284	0,0189	0,0115	0,0107
Média	0,0304	0,0223	0,0177	0,0095
DP	0,0028	0,0048	0,0087	0,0016
CV	0,0909	0,2156	0,4928	0,1720

Tabela 8A: Variação da atividade da GLUDH (NADPH) por 30h à diferentes temperaturas em pH 7,5

Tempo	Atividade (mg/mLxs)				Média	DP	CV
	30°C	35°C	40°C	45°C			
0,00	0,0279	0,0414	0,0551	0,0809	0,0513	0,0226	0,4409
0,25	0,0318	0,0466	0,0569	0,0806	0,0540	0,0205	0,3802
0,50	0,0297	0,0401	0,0530	0,0821	0,0512	0,0227	0,4428
0,75	0,0337	0,0409	0,0608	0,0790	0,0536	0,0204	0,3815
1,00	0,0364	0,0446	0,0523	0,0788	0,0530	0,0184	0,3464
1,25	0,0308	0,0393	0,0564	0,0840	0,0526	0,0235	0,4460
1,50	0,0298	0,0444	0,0628	0,0794	0,0541	0,0216	0,3994
1,75	0,0292	0,0431	0,0573	0,0786	0,0521	0,0211	0,4052
2,00	0,0309	0,0416	0,0608	0,0873	0,0552	0,0247	0,4487
4,00	0,0512	0,0465	0,0627	0,0793	0,0599	0,0146	0,2436
6,00	0,0300	0,0414	0,0569	0,0582	0,0466	0,0135	0,2886
8,00	0,0469	0,0382	0,0644	0,0555	0,0513	0,0113	0,2197
10,00	0,0321	0,0398	0,0615	0,0592	0,0482	0,0145	0,3004
24,00	0,0377	0,0412	0,0532	0,0700	0,0505	0,0146	0,2886
30,00	0,0352	0,0432	0,0491	0,0695	0,0493	0,0147	0,2975
Média	0,0342	0,0422	0,0575	0,0748			
DP	0,0067	0,0025	0,0045	0,0100			
CV	0,1950	0,0599	0,0783	0,1335			

Tabela 9A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática

Tempo	Atividade (mg/mLxs)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
0,00	0,0279	0,0414	0,0551	0,0809
0,25	0,0318	0,0466	0,0569	0,0806
0,50	0,0297	0,0401	0,0530	0,0821
0,75	0,0337	0,0409	0,0608	0,0790
1,00	0,0364	0,0446	0,0523	0,0788
1,25	0,0308	0,0393	0,0564	0,0840
1,50	0,0298	0,0444	0,0628	0,0794
1,75	0,0292	0,0431	0,0573	0,0786
2,00	0,0309	0,0416	0,0608	0,0873
4,00	0,0512	0,0465	0,0627	0,0793
6,00	0,0300	0,0414	0,0569	0,0582
8,00	0,0469	0,0382	0,0644	0,0555
10,00	0,0321	0,0398	0,0615	0,0592
Média	0,0339	0,0421	0,0585	0,0756
DP	0,0071	0,0027	0,0039	0,0106
CV	0,2102	0,0639	0,0665	0,1396
24,00	0,0377	0,0412	0,0532	0,0700
Média	0,0349	0,0405	0,0574	0,0646
DP	0,0040	0,0010	0,0059	0,0076
CV	0,1135	0,0244	0,1023	0,1182
30,00	0,0352	0,0432	0,0491	0,0695
Média	0,0365	0,0422	0,0512	0,0698
DP	0,0018	0,0014	0,0029	0,0004
CV	0,0485	0,0335	0,0567	0,0051

Tabela 10A: Variação da atividade da GLUDH (NADPH) por 30h em diferentes pHs à 30°C

Tempo (h)	Atividade (mg/mLxs)				Média	DP	CV
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5			
0,00	0,0225	0,0246	0,0207	0,0141	0,0205	0,0045	0,2217
0,25	0,0233	0,0254	0,0227	0,0102	0,0204	0,0069	0,3381
0,50	0,0141	0,0146	0,0191	0,0116	0,0149	0,0031	0,2103
0,75	0,0145	0,0169	0,0238	0,0099	0,0163	0,0058	0,3562
1,00	0,0134	0,0201	0,0208	0,0082	0,0156	0,0060	0,3820
1,25	0,0191	0,0175	0,0172	0,0077	0,0154	0,0052	0,3372
1,50	0,0153	0,0250	0,0199	0,0181	0,0196	0,0041	0,2085
1,75	0,0159	0,0161	0,0216	0,0118	0,0164	0,0040	0,2460
2,00	0,0301	0,0387	0,0226	0,0102	0,0254	0,0121	0,4756
4,00	0,0300	0,0339	0,0261	0,0119	0,0255	0,0096	0,3766
6,00	0,0285	0,0390	0,0246	0,0138	0,0265	0,0104	0,3932
8,00	0,0289	0,0418	0,0238	0,0147	0,0273	0,0113	0,4143
10,00	0,0280	0,0453	0,0273	0,0164	0,0293	0,0119	0,4084
24,00	0,0348	0,0545	0,0251	0,0131	0,0319	0,0175	0,5490
30,00	0,0328	0,0440	0,0277	0,0230	0,0319	0,0090	0,2830
Média	0,0234	0,0305	0,0229	0,0130			
DP	0,0075	0,0127	0,0030	0,0040			
CV	0,3211	0,4175	0,1327	0,3077			

Tabela 11A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática

Tempo (h)	Atividade (mg/mLxs)			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5
0,00	0,0225	0,0246	0,0207	0,0141
0,25	0,0233	0,0254	0,0227	0,0102
0,50	0,0141	0,0146	0,0191	0,0116
0,75	0,0145	0,0169	0,0238	0,0099
1,00	0,0134	0,0201	0,0208	0,0082
1,25	0,0191	0,0175	0,0172	0,0077
1,50	0,0153	0,0250	0,0199	0,0181
1,75	0,0159	0,0161	0,0216	0,0118
2,00	0,0301	0,0387	0,0226	0,0102
4,00	0,0300	0,0339	0,0261	0,0119
6,00	0,0285	0,0390	0,0246	0,0138
8,00	0,0289	0,0418	0,0238	0,0147
10,00	0,0280	0,0453	0,0273	0,0164
Média	0,0218	0,0276	0,0223	0,0122
DP	0,0067	0,0108	0,0028	0,0031
CV	0,3075	0,3916	0,1272	0,2538
24,00	0,0348	0,0545	0,0251	0,0131
Média	0,0314	0,0499	0,0262	0,0148
DP	0,0048	0,0065	0,0016	0,0023
CV	0,1531	0,1304	0,0594	0,1582
30,00	0,0328	0,0440	0,0277	0,0230
Média	0,0338	0,0493	0,0264	0,0181
DP	0,0014	0,0074	0,0018	0,0070
CV	0,0418	0,1508	0,0696	0,3878

Tabela 12A: Variação da atividade da GLUDH (NADPH) por 30h à diferentes temperaturas em pH 7,5

Tempo (h)	Atividade (mg/mL*s)				Média	DP	CV
	30°C	35°C	40°C	45°C			
0,00	0,0313	0,0274	0,0414	0,0632	0,0408	0,0160	0,3929
0,25	0,0303	0,0214	0,0501	0,0798	0,0454	0,0259	0,5701
0,50	0,0269	0,0313	0,0518	0,0743	0,0461	0,0217	0,4714
0,75	0,0260	0,0332	0,0540	0,0733	0,0466	0,0214	0,4586
1,00	0,0242	0,0474	0,0517	0,0719	0,0488	0,0196	0,4011
1,25	0,0245	0,0473	0,0534	0,0615	0,0467	0,0159	0,3404
1,50	0,0243	0,0410	0,0510	0,0531	0,0424	0,0131	0,3103
1,75	0,0254	0,0480	0,0515	0,0665	0,0479	0,0170	0,3549
2,00	0,0260	0,0427	0,0511	0,0779	0,0494	0,0217	0,4383
4,00	0,0247	0,0356	0,0493	0,071	0,0452	0,0200	0,4420
6,00	0,0333	0,0451	0,0492	0,0723	0,0500	0,0163	0,3269
8,00	0,0417	0,0390	0,0456	0,0685	0,0487	0,0135	0,2767
10,00	0,0262	0,0417	0,0451	0,0669	0,0450	0,0168	0,3729
24,00	0,0356	0,0401	0,0302	0,0333	0,0348	0,0042	0,1198
30,00	0,0313	0,0516	0,0432	0,0255	0,0379	0,0117	0,3096
Média	0,0288	0,0395	0,0479	0,0639			
DP	0,0051	0,0084	0,0061	0,0156			
CV	0,1767	0,2125	0,1283	0,2438			

Tabela 13A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática.

Tempo (h)	Atividade (mg/mL*s)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
0,00	0,0313	0,0274	0,0414	0,0632
0,25	0,0303	0,0214	0,0501	0,0798
0,50	0,0269	0,0313	0,0518	0,0743
0,75	0,0260	0,0332	0,0540	0,0733
1,00	0,0242	0,0474	0,0517	0,0719
1,25	0,0245	0,0473	0,0534	0,0615
1,50	0,0243	0,0410	0,0510	0,0531
1,75	0,0254	0,0480	0,0515	0,0665
2,00	0,0260	0,0427	0,0511	0,0779
4,00	0,0247	0,0356	0,0493	0,071
6,00	0,0333	0,0451	0,0492	0,0723
8,00	0,0417	0,0390	0,0456	0,0685
10,00	0,0262	0,0417	0,0451	0,0669
Média	0,0281	0,0385	0,0496	0,0692
DP	0,0050	0,0083	0,0036	0,0072
CV	0,1789	0,2156	0,0724	0,1037
24,00	0,0356	0,0401	0,0302	0,0333
Média	0,0309	0,0409	0,0377	0,0501
DP	0,0066	0,0011	0,0105	0,0238
CV	0,2151	0,0277	0,2798	0,4742
30,00	0,0313	0,0516	0,0432	0,0255
Média	0,0335	0,0459	0,0367	0,0294
DP	0,0030	0,0081	0,0092	0,0055
CV	0,0909	0,1774	0,2505	0,1876

Tabela 14A: Variação da atividade da GLUDH (NADH) por 30h em diferentes pHs à 30°C

Tempo (h)	Atividade (mg/mL*s)				Média	DP	CV
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5			
0,00	0,017	0,021	0,0204	0,0117	0,0175	0,0043	0,2433
0,25	0,0194	0,0198	0,0174	0,0108	0,0169	0,0042	0,2473
0,50	0,0195	0,0144	0,0113	0,0076	0,0132	0,0050	0,3816
0,75	0,0177	0,0171	0,0142	0,0087	0,0144	0,0041	0,2850
1,00	0,0177	0,0148	0,012	0,0086	0,0133	0,0039	0,2930
1,25	0,0164	0,0185	0,0134	0,0085	0,0142	0,0043	0,3055
1,50	0,014	0,0192	0,0176	0,0038	0,0137	0,0069	0,5068
1,75	0,0256	0,0191	0,0135	0,0063	0,0161	0,0082	0,5089
2,00	0,0199	0,0179	0,0161	0,002	0,0140	0,0081	0,5820
4,00	0,0175	0,0225	0,0144	0,0049	0,0148	0,0074	0,4999
6,00	0,0209	0,0364	0,0238	0,0066	0,0219	0,0122	0,5580
8,00	0,0192	0,0183	0,0327	0,0151	0,0213	0,0078	0,3651
10,00	0,0212	0,0232	0,0262	0,0149	0,0214	0,0048	0,2237
24,00	0,0261	0,0216	0,0308	0,0208	0,0248	0,0046	0,1859
30,00	0,0152	0,0191	0,0285	0,0191	0,0205	0,0057	0,2763
Média	0,01915	0,02019	0,01949	0,00996			
DP	0,00337	0,00512	0,00716	0,00547			
CV	0,17604	0,25359	0,36737	0,54883			

Tabela 15A: Coeficiente de variância entre determinados períodos do teste de estabilidade enzimática.

Tempo (h)	Atividade (mg/mL*s)			
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5
0,00	0,0170	0,0210	0,0204	0,0117
0,25	0,0194	0,0198	0,0174	0,0108
0,50	0,0195	0,0144	0,0113	0,0076
0,75	0,0177	0,0171	0,0142	0,0087
1,00	0,0177	0,0148	0,0120	0,0086
1,25	0,0164	0,0185	0,0134	0,0085
1,50	0,0140	0,0192	0,0176	0,0038
1,75	0,0256	0,0191	0,0135	0,0063
2,00	0,0199	0,0179	0,0161	0,0020
4,00	0,0175	0,0225	0,0144	0,0049
6,00	0,0209	0,0364	0,0238	0,0066
8,00	0,0192	0,0183	0,0327	0,0151
10,00	0,0212	0,0232	0,0262	0,0149
Média	0,0189	0,0202	0,0179	0,0084
DP	0,0028	0,0055	0,0063	0,0039
CV	0,1484	0,2730	0,3516	0,4681
24,00	0,0261	0,0216	0,0308	0,0208
Média	0,0237	0,0224	0,0285	0,0179
DP	0,0035	0,0011	0,0033	0,0042
CV	0,1465	0,0505	0,1141	0,2337
30,00	0,0152	0,0191	0,0285	0,0191
Média	0,0207	0,0204	0,0297	0,0200
DP	0,0077	0,0018	0,0016	0,0012
CV	0,3732	0,0869	0,0549	0,0603

Tabela 16A: Conversão da G6P e da amônia durante o período de 30h de reação com o NADP imobilizado, a 30C e pH 7,3.

Tempo (h)	Absorbância	G6P	Conversão (%)	Absorbância	Amônia	Conversão (%)
0	0,0000	0,0000	100,00	0,0000	0,0000	0,00
0,25	0,0000	0,0000	100,00	0,0000	0,0000	0,00
0,5	0,2551	3,0144	55,30	0,0000	0,0000	0,00
0,75	0,3494	4,0622	39,77	0,0000	0,0000	0,00
1	0,2993	3,5056	48,02	0,0000	0,0000	100,00
2	0,4961	5,6922	15,60	0,1936	23,3705	19,48
3	0,4594	5,2844	21,65	0,4339	35,3855	0,00
4	0,4046	4,6756	30,67	0,5524	41,3105	0,00
5	0,1909	2,3011	65,88	0,3545	31,4155	0,00
6	0,2945	3,4522	48,81	0,1293	20,1555	30,56
7	0,3892	4,5044	33,21	0,3114	29,2605	0,00
8	0,3910	4,5244	0,00	0,3962	33,5005	0,00
9	-	-	-	-	-	-
10	0,4120	4,7578	0,00	0,4025	33,8155	5,65
11	-	-	-	-	-	-
12	0,4129	4,7678	0,00	0,4173	34,5555	3,59
13	0,4114	4,7511	0,00	0,4731	37,3455	0,00
14	0,4723	5,4278	0,00	0,1965	23,5155	34,39
15	0,4675	5,3744	0,00	0,1832	22,8505	36,24
16	-	-	-	-	-	-
17	0,4422	5,0933	-	0,1687	22,1255	38,27
18	0,4440	5,1133	0,00	0,1691	22,1455	38,21
19	-	-	-	-	-	-
20	0,4054	4,6844	0,00	0,1681	22,0955	38,35
21	0,4017	4,6433	0,00	0,1695	22,1655	38,16
22	0,4624	5,3178	0,00	0,1773	22,5555	37,07
23	0,4485	5,1633	0,00	0,1710	22,2405	37,95
24	0,2437	2,8878	57,18	0,0753	17,4555	39,86
25	0,1194	1,5067	77,66	0,0562	16,5005	43,15
26	0,3205	3,7411	44,53	0,1008	18,7305	35,47
27	0,4937	5,6656	16,00	0,1553	21,4555	26,08
28	0,2260	2,6911	60,10	0,0321	15,2955	47,30
29	0,4129	4,7678	29,31	0,1089	19,1355	34,07
30	0,5910	6,7467	0,00	0,1920	23,2905	19,76
G6P/Amônia	0,5908	6,7444	-	0,3067	29,0255	-
Mista	0,3909	4,5233	-	0,4430	35,8405	-

ANEXO II – Resumos submetidos à eventos

**XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, São Paulo-SP,
2008**

REGENERAÇÃO ENZIMÁTICA DE COFADORES BETA- NICOTINAMIDA ADENÍNICOS: CARACTERIZAÇÃO DA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE

DIANA ZUKAS ANDREOTTI (PG), ESTER JUNKO TOMOTANI (PD), MICHELE VITOLO.

Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica, FCF/USP

Introdução e Objetivo: A glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é encontrada em animais, vegetais e microrganismos. O *Saccharomyces cerevisiae* e o *Leuconostoc mesenteroides* são as principais fontes de G6PDH comercial. É muito usada em análises clínicas (como marcador em enzimaímunoensaios). Catalisa a oxidação da glicose 6-fosfato (G6P) em ácido 6-fosfo-glicônico na presença de NADP ou NAD. Neste trabalho, caracterizou-se cineticamente a G6PDH frente ao G6P e ao NADP, para posterior uso em sistemas bienzimáticos, visando a regeneração contínua de cofatores beta-nicotinamida adenínicos (NADP /NADPH ou NAD/NADH) em biorreatores.

Materiais e Métodos: Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionaram-se 910µL de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; MgCl₂ 5mM), 10µL de G6PDH (0,1U), 40µL de 0,3mM G6P e 40µL de 100µM NADP. A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADPH formado foi registrada a 340nm. A atividade da G6PDH foi avaliada frente ao pH (7,0-8,5), à temperatura (30-45°C), e às concentrações de NADP (1-20µM) e G6P (3-30µM). A estabilidade da G6PDH foi avaliada por 30h frente ao pH e à temperatura. A unidade de atividade (U) foi expressa como µM de NADPH/s.

Resultados e Conclusão: As constantes cinéticas frente ao cofator e ao substrato foram calculadas através do método convencional de Lineweaver-Burk, sendo $(K_m)_{G6P} = 26\mu M$, $(V_{max})_{G6P} = 0,14\mu M/s$, $(K_m)_{NADP} = 15\mu M$ e $(V_{max})_{NADP} = 0,11\mu M/s$. A maior atividade ocorreu a 40°C (0,0395 µM/s), porém a maior estabilidade foi observada a 30°C. Em pH 7,5, observou-se a maior atividade para a G6PDH.

**III Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de los alimentos, Abril de 2009,
Córdoba, Argentina**

**IMMOBILIZATION OF BETA NICOTINAMIDE-ADENINE COFACTORS
FOR ENZYMATIC REACTIONS INVOLVING OXIDORREDUCTASES**

Andreotti DZ; Tomotani EJ; Vitolo M

School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil.

dzandreotti@usp.br

The oxidoreductases are enzymes widely distributed in nature and are used in analytical methods for diagnostic purposes (such as a marker in immunoassays) and in quality control of foods and medicines. The reactions catalyzed by these enzymes are expensive due to being cofactor (NAD/NADH and NADP/NADPH) dependent. One kilogram of NADPH costs around US\$5,000.00. However, if it were re-used, the original cost would be reduced 100 times. This project analyzes the best conditions for cofactor immobilization for their later usage in reactions employing oxidoreductases.

For the immobilization process, Dowex[®] 1x2, 1x4 and 1x8 were used. The resins were washed with 25 mL of distilled water at pH adjusted to 7.0; 7.5; 8.0 or 8.5. The mixtures were kept in a shaker for 24 hours, at 30°C and 100 rpm. After this period, the mixtures were centrifuged for 30 min and at 3000xg/30min. The supernatant was discarded and the precipitate was re-suspended in 20 mL of distilled water with adjusted pH plus 5 mL of 2.22×10^{-5} M of NADP or NAD. The suspensions were shaken for 4h, at 30°C and 100 rpm. Afterwards, the precipitates were separated by centrifugation (3000xg/30min). The amount of free cofactor was determined through 1mL samples of the supernatant in a spectrophotometer ($\lambda=260\text{nm}$).

At the above pH interval, due to the cofactors being fully ionized, the immobilization efficiency for both cofactors was always over 95%. The result is suitable because the pH for immobilization matches with the optimum pH for oxidoreductases like glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutamate dehydrogenase (GLUDH). As a further step, G6PDH and GLUDH will be employed together to re-cycle the immobilized cofactor.

Keywords: Oxidoreductases; cofactor immobilization; cofactor recycling

Welcome: DIANA ZUKAS ANDREOTTI

Thanks for your participation at the III International Congress of Food Science & Technology (CICYTAC 2009). Before you go on, we suggest to read the User's Manual clicking [Here](#)

Papers Management			Grade
Título:	IMMOBILIZATI	View Paper	Aprobado
Título:		New Paper	
Título:		New Paper	

[Report a Problem](#)

XVII SINAFERM – NATAL/RN – AGOSTO/2009**Emprego de oxidoredutases na interconversão das formas oxidada e reduzida do NADP.****Diana Zukas Andreotti, Ester Junko Tomotani e Michele Vitolo**

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Depto. de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica. Av Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Butantã - São Paulo – SP, CEP: 05508-900.

E-mail: dzandreotti@usp.br

RESUMO

As bioconversões executadas com enzimas, que requerem NADP ou NADPH, são limitadas pela eficiência com que esta substância é mantida na forma particular requerida pelo catalisador ao longo de toda a reação, assim como pela sua recuperação no final do processo. Neste trabalho, estudou-se o reciclo NADP/NADPH em sistema constituído pela glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutamato desidrogenase (GLUDH). Em tubo com 10 mL de capacidade, colocou-se 5,9 mL de tampão TRIS-HCl (0,05 M; pH 7,3; 5mM MgCl₂), 2,5 mL de G6P (50mM), 0,050 mL de G6PDH (2U), 0,35 mL de 2-oxoglutarato (0,2M), 0,5 mL de GLUDH (4U), 0,5 mL de amônia (3,2M) e 0,2 mL de NADP (500µM). A reação durou 90min e foi executada às temperaturas de 30°C e 40°C. Em ambas as condições, mais de 85% das concentrações iniciais de G6P e NH₄⁺, respectivamente, substratos da G6PDH e GLUDH, foram convertidas, sendo o reciclo NADP/NADPH mantido durante toda a reação.

Palavras Chaves: regeneração de cofatores, sistema bienzimático, glicose-6-fosfato desidrogenase, glutamato desidrogenase.

INTRODUÇÃO

As oxidoredutases são enzimas, que, por possuírem especificidade e regioseletividade altas, têm grande potencial de uso na síntese de compostos quirálicos, em reações de polimerização e no tratamento de efluentes industriais (KULA e KRAGL, 2000).

Grosso modo, as oxidoredutases podem ser subdivididas em dois grandes grupos, a saber, aquelas que possuem o cofator ligado covalentemente à molécula (por ex., glicoseoxidase e peroxidase) e aquelas em que o cofator, a princípio livre em solução, deve se ligar transitoriamente à molécula para que a catálise se concretize (por ex., álcool desidrogenase, glicose 6-fosfato desidrogenase, glutamato desidrogenase, manitol desidrogenase) (ROCHA FILHO, VITOLO, 1998; PENNACCHIO, et al., 2008). Em ambos os casos o cofator deve ser regenerado “in situ”. No caso das enzimas em que o cofator é um grupo prostético, sua regeneração se dá através da participação de um substrato auxiliar (oxigênio no caso da glicoseoxidase, por exemplo), ao passo que para aquelas em que o cofator é solúvel – coenzima – sua regeneração, geralmente, é catalisada por uma reação enzimática acoplada, para a qual o cofator oxidado ou reduzido atua como co-substrato.

A aplicação industrial das oxidoredutases tem se restringido àquelas que possuem o grupo redox inserido permanentemente em suas moléculas e, dentre estas, as de maior uso são a glicoseoxidase e a peroxidase (TOMOTANI et al., 2005).

As oxidorreduções dependentes de cofatores adenínicos – que aparentemente são as de maior interesse prático (LIU & WANG, 2007) - representam cerca de um quarto de todas as enzimas conhecidas, porém poucas são usadas fora da área analítica. A razão principal disto é a dificuldade de se regenerar com eficiência o cofator, fato que leva a sua perda durante a reação elevando os custos do processo, já que normalmente são mais caros do que a enzima. Este fato implica no uso acoplado de oxidorreduções, onde uma promove a redução e a outra a oxidação do cofator.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar a possibilidade do reciclo NADP/NADPH ocorrer concomitantemente com a oxidação da glicose 6-fosfato pela glicose 6-fosfato desidrogenase e redução do 2-oxoglutarato (em presença de amônia) pela glutamato desidrogenase.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

As enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* e a glutamato desidrogenase (GLUDH) de fígado bovino, bem como os cofatores (NADP e NADPH), a glicose 6-fosfato e o 2-oxoglutarato foram adquiridos da SIGMA®. Os demais reagentes (grau pA) eram de marcas tradicionais.

MÉTODOS

Determinação da Atividade da Glicose 6-fosfato Desidrogenase (BERGMEYER, 1984).

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 910 µL de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; 5mM MgCl₂), 10 µL de G6PDH (0,1 U), 40 µL de G6P (0,3mM) e 40 µL de NADP (100 µM). A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADPH formado foi registrada a 340nm. Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 µmol de NADP/min nas condições do experimento. O preparado enzimático utilizado tinha atividade de 0,0368µM de NADPH formado/s.

A atividade da G6PDH foi avaliada frente à temperatura (30° C; 35° C; 40° C; 45° C) e pH (7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

Teste de Estabilidade da G6PDH.

Para esse procedimento, foi utilizada a metodologia descrita anteriormente, sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, mantida a diferentes temperaturas (30°C; 35°C; 40°C; 45°C) e pH 7,5. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante 2 horas.

Determinação da Atividade da Glutamato Desidrogenase (BERGMEYER, 1984)

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 720 µL de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; 5mM MgCl₂), 100 µL de GLUDH (4 U), 70 µL de 2-oxo-glutarato (0,2M), 100 µL de sulfato de amônia (3,2M) e 10 µL de NADPH (10 mg/mL). A reação foi realizada a 30°C por 180s. A cada 30s, a quantidade de NADPH consumida foi registrada a 340nm. Uma unidade de atividade enzimática (U_{GLUDH}) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1µmol de NADPH por minuto nas condições do experimento. O preparado enzimático empregado tinha atividade de 0,0245µM de NADPH consumido/s.

A atividade da GLUDH foi avaliada frente à temperatura (30° C; 35° C; 40° C; 45° C) e pH (7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

Teste de Estabilidade da GLUDH

Neste caso, também foi utilizada a metodologia descrita anteriormente, sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, mantida a diferentes temperaturas (30°C; 35°C; 40°C; 45°C) e pH 7,5. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante 2 horas.

Regeneração do NADP/NADPH na forma solúvel em regime descontínuo.

A partir dos valores das atividades da G6PDH e da GLUDH, estabeleceu-se a seguinte diretriz para o uso combinado da G6PDH e GLUDH, visando o reciclo NADP/NADPH: em um tubo de ensaio foram adicionados 5,9 mL de tampão TRIS-HCl (0,05 M; pH 7,3; 5mM MgCl₂), 2,5 mL de G6P (50mM), 0,050 mL de G6PDH (2U), 0,35 mL de 2-oxoglutarato (0,2M), 0,5 mL de GLUDH (4U) e 0,5 mL de amônia (3,2 M). Após a adição de 0,2 mL de NADP (500µM), passou-se a medir o tempo de reação e após 10min, 30min, 60min e 90min foram tomadas amostras para a dosagem de amônia, G6P, NADP e NADPH. A reação foi executada às temperaturas de 30°C e 40°C.

Determinações Analíticas

Dosagem dos Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores será determinada usando o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por TOMOTANI (2002).

Dosagem da amônia

A determinação da amônia será feita usando o reativo de Nessler, conforme adaptação feita por ROSSI, et. al., (1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da Figura 1, infere-se que a maior atividade da G6PDH ocorre a 45° C e pH 7,5 ($v = 0,0338 \mu\text{M/s}$), enquanto que para a GLUDH a maior atividade ($v = 0,36 \text{ mg/mL.s}$) ocorre a pH 7,0 independentemente da temperatura. Chama a atenção os perfis distintos das curvas referentes a cada uma das enzimas. A razão disto deve-se às diferenças estruturais das enzimas – sobretudo no nível quaternário de organização - haja vista a G6PDH e a GLUDH serem constituídas por duas e seis cadeias peptídicas, respectivamente. (PETERSON e SMITH, 1999).

Figura 1. Variação das atividades da G6PDH e da GLUDH frente a diferentes temperaturas combinadas com diferentes valores de pH. G6PDH [(■) 30°C; (●) 35°C; (▲) 40°C e (◆) 45°C] e GLUDH [(□) 30°C; (○) 35°C; (Δ) 40°C e (◇) 45°C].

A Figura 2 mostra a estabilidade das enzimas frente às temperaturas de 30°C, 40°C e 45°C por um período de 2h. Observa-se que a GLUDH é estável frente a qualquer uma das temperaturas avaliadas, enquanto que a G6PDH só é estável a 30°C, perdendo, inclusive, quase toda a sua atividade após submissão a 45°C por 1,5h.

Figura 2. Estabilidade frente à temperatura, por um período de 2h, da G6PDH [(■) 30°C; (●) 35°C; (▲) 40°C e (◆) 45°C] e GLUDH [(□) 30°C; (○) 35°C; (Δ) 40°C e (◇) 45°C].

Observa-se, da Figura 3, que após 10min de reação mais de 90% e de 85%, respectivamente, da amônia e do G6P iniciais foram convertidos, inclusive, independentemente da temperatura empregada. Além disso, da Tabela 1 nota-se que a formação de NADPH foi favorecida pelo aumento da temperatura, haja vista a razão NADPH/NADP a 30°C e 40°C ter sido igual a 0,82 e 1,47, respectivamente. No entanto, à mesma temperatura, as concentrações de NADP e NADPH apresentaram variações próximas, a saber, 30°C [NADP: 4,3%; NADPH: 2,0%] e 40°C [NADP: 14%; NADPH: 12,0%]. Estes resultados indicariam que os cofatores teriam sido efetivamente reciclados durante a reação (Tabela 1).

Figura 3. Consumo de glicose 6-fosfato e de amônia, devido à ação simultânea da glicose 6-fosfato desidrogenase e da glutamato desidrogenase, frente às temperaturas de 30°C [(●) G6P e (■) NH₄⁺] e 40°C [(○) G6P e (□) NH₄⁺].

Tabela 1. Concentração dos cofatores ao longo da reação executada às temperaturas de 30°C e 40°C em pH 7,3. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de NADP (500μM), à mistura constituída por 0,05 mL de G6PDH (2U), 0,5 mL de GLUDH (4U), 5,9 mL de tampão Tris (0,05 M, pH 7,3), 0,5 mL de NH₄⁺ (3,2 M), 0,35 mL de 2-Oxoglutarato (0,2 M) e 2,5 mL de G6P (50 mM) .

TEMPO (MIN)	TEMPERATURA (°C)	COFATOR	
		NADP (M)x10 ⁻⁵	NADPH (M)x10 ⁻⁵
10	30	3,17	2,50
	40	3,63	5,42
30	30	3,01	2,44
	40	3,46	4,79
60	30	2,93	2,40
	40	3,00	4,16
90	30	2,82	2,37
	40	2,48	4,08
Coeficiente de variação (%)	30	4,3	2
	40	14	12

CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que os parâmetros para a catálise com glicose-6-fosfato desidrogenase são 30°C e pH 7,5, condições nas quais a atividade enzimática é maior e sua estrutura mantém-se estável. Já para a glutamato desidrogenase, as melhores condições para reação são pH 8,0 e 40°C, parâmetros em que a enzima mantém-se estável e tem boa atividade. Para a reação descontínua acoplada, cujo pH foi mantido em 7,3 e a temperatura em 30°C, os dados obtidos para um tempo total de reação de 90min, mostram o estabelecimento da condição cíclica NADP/NADPH, com a concomitante conversão dos substratos amônia e G6P. Em vista dos resultados obtidos, serão feitas adaptações nos parâmetros encontrados para as duas

enzimas estudadas, a fim de juntá-las em um sistema reacional bienzimático contínuo, com o cofator imobilizado e solúvel.

REFERÊNCIAS

BERGMEYER, H.U., Ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984, v.2, 539p.

KULA, M.R., KRAGL, U., Dehydrogenases in synthesis of chiral compounds, in: RAMESH, N.P., Editor, **Stereoselective Biocatalysis**, New York, USA, Marcel Dekker, p.839–866, 2000.

LIU, W., WANG, P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis, **Biotechnology Advances**, v.25, p.369-384, 2007.

PENNACHIO, A., PUCCI, B., SECUNDO, F., LA CARA, F., RONI, M., RAIA, C.A., Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-claim NAD(H) – Dependent dehydrogenase from *Thermus thermophilus*., **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.13, p.3949-3958, 2008.

PERTERSON, E.P.; SMITH, T.J. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. **Structure**, v.7, 769-782, 1999.

ROCHA-FILHO, J.A., VITOLO, M. **Enzimas no Contexto da Síntese Orgânica**. São Paulo, Ed. Dos Autores, 1998. p.43.

TOMOTANI, E.J. **Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo DOWEX): seu uso na modificação da sacarose**. São Paulo, 2002, p. 16, Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

UEM

Universidade Estadual de Maringá
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

IX SHEB

IX SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

Maringá, 23 a 27 de novembro de 2009

USO DE OXIDORREDUTASES PARA A INTERCONVERSÃO DAS FORMAS OXIDADA E REDUZIDA DO NADP EM REATOR DESCONTÍNUO

Diana Zukas Andreotti*, Ester Junko Tomotani e Michele Vitolo

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Depto. de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Butantã - São Paulo – SP - Brasil, CEP: 05508-900.

E-mail: dzandreotti@usp.br

RESUMO

As bioconversões executadas com enzimas, que requerem NADP ou NADPH, são limitadas pela eficiência com que esta substância é mantida na forma particular requerida pelo catalisador ao longo de toda a reação, assim como pela sua recuperação no final do processo. Neste trabalho, estudou-se o reciclo NADP/NADPH em sistema constituído pela glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutamato desidrogenase (GLUDH). Em tubo com 10 mL de capacidade, colocou-se 5,9 mL de tampão TRIS-HCl (0,05 M; pH 7,3; 5mM MgCl₂), 2,5 mL de G6P (50mM), 0,050 mL de G6PDH (2U), 0,35 mL de 2-oxoglutarato (0,2M), 0,5 mL de GLUDH (4U), 0,5 mL de amônia (3,2M) e 0,2 mL de NADP (500µM), solúvel ou imobilizado. A reação durou 90min e foi executada às temperaturas de 30°C e 40°C. Em ambas as condições, mais de 75% das concentrações iniciais de G6P e NH₄⁺, respectivamente, substratos da G6PDH e GLUDH, foram convertidas, sendo o reciclo NADP/NADPH mantido durante toda a reação.

PALAVRAS CHAVE: NADP, interconversão, reator descontínuo, imobilização.

ABSTRACT

The efficiency of bioconversions performed with enzymes that require coenzyme (NADP/NADPH) depends on the capability on recycling the oxi-red forms of the coenzymes during the reactions, as well as its recovery at the end of the process. In this work, it was studied the recycle NADP / NADPH by using a coupled bi-enzyme system consisted by glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutamate dehydrogenase (GLUDH). In a 10mL-tube were introduced 5.9 mL of Tris-HCl (0.05 M, pH 7.3, 5mM MgCl₂), 2.5 mL of G6P (50 mM), 0.050 mL of G6PDH (2U), 0.35 mL of 2-oxoglutarate (0.2 M), 0.5 mL of GLUDH (4U), 0.5 mL of ammonia (3.2 M) and 0.2 mL of NADP (500µM), soluble or immobilized. The reaction was carried out for 90min at temperatures of 30 ° C and 40 ° C. Independently on the conditions employed, the NADP/NADPH recycling was maintained all over the reaction and more than 75% of the initial concentration of NH₄⁺ (GLUDH substrate) and G6P (G6PDH substrate) were consumed.

KEY WORDS: NADP/NADPH, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, coenzyme immobilization.

1. INTRODUÇÃO

As oxidorredutases são enzimas, que, por possuírem especificidade e regioseletividade altas, têm grande potencial de uso na síntese de compostos quiráticos, em reações de polimerização e no tratamento de efluentes industriais, Kula & Kragl (1).

Grosso modo, as oxidorredutases podem ser subdivididas em dois grandes grupos, a saber, aquelas que possuem o cofator ligado covalentemente à molécula (por ex., glicoseoxidase e peroxidase) e aquelas em que o cofator, a princípio livre em solução, deve se ligar transitoriamente à molécula para que a catálise se concretize (por ex., álcool desidrogenase, glicose 6-fosfato desidrogenase, glutamato desidrogenase, manitol desidrogenase), Rocha filho & Vitolo (2); Pennacchio, et al. (2). Em ambos os casos o cofator deve ser regenerado “in situ”. No caso das enzimas em que o cofator é um grupo prostético, sua regeneração se dá através da participação de um substrato auxiliar (oxigênio no caso da glicoseoxidase, por exemplo), ao passo que para aquelas em que o cofator é solúvel – coenzima – sua regeneração, geralmente, é catalisada por uma reação enzimática acoplada, para a qual o cofator oxidado ou reduzido atua como co-substrato.

A aplicação industrial das oxidorredutases tem se restringido àquelas que possuem o grupo redox inserido permanentemente em suas moléculas e, dentre estas, as de maior uso são a glicoseoxidase e a peroxidase, Tomotani et al. (4).

As oxidorredutases dependentes de cofatores adenínicos – que aparentemente são as de maior interesse prático, Liu & Wang (5) - representam cerca de um quarto de todas as enzimas conhecidas, porém poucas são usadas fora da área analítica. A razão principal disto é a dificuldade de se regenerar com eficiência o cofator, fato que leva a sua perda durante a reação elevando os custos do processo, já que normalmente são mais caros do que a enzima. Este fato implica no uso acoplado de oxidorredutases, onde uma promove a redução e a outra a oxidação do cofator.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar a possibilidade do reciclo NADP/NADPH, solúvel ou imobilizado, ocorrer concomitantemente com a oxidação da glicose 6-fosfato pela glicose 6-fosfato desidrogenase e redução do 2-oxoglutarato (em presença de amônia) pela glutamato desidrogenase.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

As enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* e a glutamato desidrogenase (GLUDH) de fígado bovino, bem como os cofatores (NADP e NADPH), a glicose 6-fosfato e o 2-oxoglutarato foram adquiridos da SIGMA[®]. Os demais reagentes (grau pA) eram de marcas tradicionais.

2.2 MÉTODOS

a) Determinação da Atividade da Glicose 6-fosfato Desidrogenase, Bergmeyer (6).

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 910 μ L de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; 5mM MgCl₂), 10 μ L de G6PDH (0,1 U), 40 μ L de G6P (0,3mM) e 40 μ L de NADP (100 μ M). A reação foi realizada a 30°C por 60s. A cada 5s, a quantidade de NADPH formado foi registrada a 340nm. Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de NADP/s nas condições do experimento. O preparado enzimático utilizado tinha atividade de 0,0368 μ M de NADPH/s.

A atividade da G6PDH foi avaliada frente à temperatura (30° C; 35° C; 40° C; 45° C) e pH (7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

b) Teste de Estabilidade da G6PDH.

Para esse procedimento, foi utilizada a metodologia descrita anteriormente, sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, mantida a diferentes temperaturas (30°C; 35°C; 40°C; 45°C) e pH 7,5. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante 2 horas.

c) Determinação da Atividade da Glutamato Desidrogenase, Bergmeyer (6).

Em uma cubeta de espectrofotômetro adicionou-se 720 μL de tampão-TRIS (0,05M; pH 7,5; 5mM MgCl_2), 100 μL de GLUDH (4 U), 70 μL de 2-oxo-glutarato (0,2M), 100 μL de sulfato de amônia (3,2M) e 10 μL de NADPH (10 mg/mL). A reação foi realizada a 30°C por 180s. A cada 30s, a quantidade de NADPH consumida foi registrada a 340nm. Uma unidade de atividade enzimática (U_{GLUDH}) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 μmol de NADPH por minuto nas condições do experimento. O preparado enzimático empregado tinha atividade de 0,0245 μM de NADPH/s.

A atividade da GLUDH foi avaliada frente à temperatura (30° C; 35° C; 40° C; 45° C) e pH (7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

d) Teste de Estabilidade da GLUDH.

Neste caso, também foi utilizada a metodologia descrita anteriormente, sendo que, para a medida da atividade, foram retiradas alíquotas da solução enzimática, mantida a diferentes temperaturas (30°C; 35°C; 40°C; 45°C) e pH 7,5. As alíquotas foram tomadas a cada 15 minutos durante 2 horas.

e) Imobilização do NADP.

Pesou-se 50mg de resina de troca iônica Dowex® código 1x4-100, selecionada por TOMOTANI, 2002. A resina foi lavada em 25 mL de água destilada com pH ajustado para 7,3. A mistura foi mantida em shaker por 24h, a 30°C e 100rpm.

Após as 24h, centrifugou-se a mistura por 30 min e 3000G e descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se a resina 20 mL de água destilada com o pH ajustado e 5 mL de cofator NADP (500 μmol s de soluto em água destilada com o pH ajustado). Alocou-se a mistura novamente no shaker por mais 4h, a 30°C e 100rpm. Após o período, centrifugou-se a amostra novamente nas mesmas condições indicadas acima. Descartou-se o sobrenadante e utilizaram-se as partículas na reação acoplada detalhada a seguir.

f) Regeneração do NADP/NADPH na forma solúvel e imobilizada em regime descontínuo.

A partir dos valores das atividades da G6PDH e da GLUDH, estabeleceu-se a seguinte diretriz para o uso combinado da G6PDH e GLUDH, visando o reciclo NADP/NADPH: em um tubo de ensaio foram adicionados 5,9 mL de tampão TRIS-HCl (0,05 M; pH 7,3; 5mM MgCl_2), 2,5 mL de G6P (50mM), 0,050 mL de G6PDH (2U), 0,35 mL de 2-oxoglutarato (0,2M), 0,5 mL de GLUDH (4U) e 0,5 mL de amônia (3,2 M). Após a adição de 0,2 mL de NADP (500 μM) ou da resina contendo o NADP imobilizado, passou-se a medir o tempo de reação e após 10min, 30min, 60min e 90min foram tomadas amostras para a dosagem de amônia, G6P, NADP e NADPH. A reação foi executada às temperaturas de 30°C e 40°C.

g) Determinações Analíticas.

Dosagem dos Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada usando o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por Tomotani (4).

Dosagem da amônia

A determinação da amônia foi feita usando o reativo de Nessler, conforme adaptação feita por Rossi, et. al. (7).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

A partir da Figura 1, infere-se que a maior atividade da G6PDH ocorre a 40° C e pH 7,5 ($v = 0,0338 \mu\text{M/s}$), enquanto que para a GLUDH a maior atividade ($v = 0,360 \text{ mg/mL.s}$) ocorre a pH 7,0 independentemente da temperatura. Chama a atenção os perfis distintos das curvas referentes a cada uma das enzimas. A razão disto deve-se às diferenças estruturais das enzimas – sobretudo no nível quaternário de organização - haja vista a G6PDH e a GLUDH serem constituídas por duas e seis cadeias peptídicas, respectivamente, Peterson & Smith (8).

Figura 1. Variação das atividades da G6PDH e da GLUDH frente a diferentes temperaturas combinadas com diferentes valores de pH. G6PDH [(■) 30°C; (●) 35°C; (▲) 40°C e (◆) 45°C] e GLUDH [(□) 30°C; (○) 35°C; (△) 40°C e (◇) 45°C].

A Figura 2 mostra a estabilidade das enzimas frente às temperaturas de 30°C, 40°C e 45°C por um período de 2h. Observa-se que a GLUDH é estável frente a qualquer uma das temperaturas avaliadas, enquanto que a G6PDH só é estável a 30°C, perdendo, inclusive, quase toda a sua atividade após submissão a 45°C por 1,5h.

Figura 2. Estabilidade frente à temperatura, por um período de 2h, em pH 7,5, da G6PDH [(■) 30°C; (●) 35°C; (▲) 40°C e (◆) 45°C] e GLUDH [(◻) 30°C; (○) 35°C; (△) 40°C e (◇) 45°C].

Observa-se, da Figura 3, que após 10min de reação mais de 90% e de 85%, respectivamente, da amônia e do G6P iniciais foram convertidos, inclusive, independentemente da temperatura empregada. Além disso, da Tabela 1 nota-se que a formação de NADPH foi favorecida pelo aumento da temperatura, haja vista a média da razão NADPH/NADP a 30°C e 40°C ter sido igual a 0,82 e 1,47, respectivamente. No entanto, à mesma temperatura, as concentrações de NADP e NADPH apresentaram variações próximas, a saber, 30°C [NADP: 4,3%; NADPH: 2,0%] e 40°C [NADP: 14%; NADPH: 12,0%]. Estes resultados indicariam que os cofatores teriam sido efetivamente reciclados durante a reação.

Figura 3. Consumo de glicose 6-fosfato e de amônia, devido à ação simultânea da glicose 6-fosfato desidrogenase e da glutamato desidrogenase, frente às temperaturas de 30°C [(●) G6P e (■) NH₄⁺] e 40°C [(○) G6P e (□) NH₄⁺] e pH 7,3.

Tabela 1. Concentração dos cofatores ao longo da reação executada às temperaturas de 30°C e 40°C em pH 7,3. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de NADP (500µM), à mistura constituída por 0,05 mL de G6PDH (2U), 0,5 mL de GLUDH (4U), 5,9 mL de tampão Tris (0,05 M, pH 7,3), 0,5 mL de NH₄⁺ (3,2 M), 0,35 mL de 2-Oxoglutarato (0,2 M) e 2,5 mL de G6P (50 mM) .

TEMPO (MIN)	TEMPERATURA (°C)	COFATOR	
		NADP (M)x10 ⁵	NADPH (M)x10 ⁵
10	30	3,17	2,50
	40	3,63	5,42
30	30	3,01	2,44
	40	3,46	4,79
60	30	2,93	2,40
	40	3,00	4,16
90	30	2,82	2,37
	40	2,48	4,08
Coeficiente de variação (%)	30	4,3	2
	40	14	12

Para a reação com o NADP imobilizado, utilizou-se como parâmetro de análise de resultado somente a conversão dos substratos G6P e amônia. Neste caso, aumentou-se a conversão do substrato amônia (100%) e houve uma menor conversão no caso da G6P (78,57%), após 90 min de reação, como ilustrado na figura 4.

Figura 4. Consumo de glicose 6-fosfato e de amônia, devido à ação simultânea da glicose 6-fosfato desidrogenase e da glutamato desidrogenase, frente às temperaturas de 30°C com o NADP imobilizado [(●) G6P e (■) NH₄⁺] e pH 7,3.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que os parâmetros para a catálise com glicose-6-fosfato desidrogenase são 30°C e pH 7,5, condições nas quais a atividade enzimática é maior e sua termoestabilidade também. Já para a glutamato desidrogenase, as melhores condições para reação são pH 8,0 e 40°C, parâmetros em que a enzima mantém-se estável e tem atividade da ordem de 0,30 mg/mL*s. Para a reação descontínua acoplada, cujo pH foi mantido em 7,3 e a temperatura em 30°C, os dados obtidos para um tempo total de reação de 90min, indicam a interconversão NADP/NADPH concomitante à conversão do substrato (NH_4^+ e G6P).

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo financiamento deste projeto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KULA, M.R., KRAGL, U., Dehydrogenases in synthesis of chiral compounds, in: RAMESH, N.P., Editor, **Stereoselective Biocatalysis**, New York, USA, Marcel Dekker, p.839–866, 2000.
2. ROCHA-FILHO, J.A., VITOLO, M. **Enzimas no Contexto da Síntese Orgânica**. São Paulo, Ed. Dos Autores, 1998. p.43.
3. PENNACHIO, A., PUCCI, B., SECUNDO, F., LA CARA, F., RONI, M., RAIA, C.A., Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-claim NAD(H) – Dependent dehydrogenase from *Thermus thermophilus*., **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.13, p.3949-3958, 2008.
4. TOMOTANI, E.J. **Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo DOWEX): seu uso na modificação da sacarose**. São Paulo, 2002, p. 16, Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
5. LIU, W., WANG, P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis, **Biotechnology Advances**, v.25, p.369-384, 2007.
6. BERGMAYER, H.U., Ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd Ed., Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984, v.2, 539p.
7. PERTERSON, E.P.; SMITH, T.J. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. **Structure**, v.7, 769-782, 1999.