
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LETÍCIA MARA LIMA ANGELINI

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE ARILACETONITRILAS α -
SUBSTITUÍDAS, BLOCOS CONSTRUTORES PARA
SÍNTESE DE DROGAS COM ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA**

LETÍCIA MARA LIMA ANGELINI

BIOTRANSFORMAÇÃO DE ARILACETONITRILAS
 α -SUBSTITUÍDAS, BLOCOS CONSTRUTORES PARA SÍNTESE DE
DROGAS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Orientadora: *CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE*

Supervisora: *DAIANE CRISTINA SASS*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2016

577.14 Angelini, Letícia Mara Lima
A582b Biotransformação de arilacetonitrilas alfa-substituídas,
blocos construtores para síntese de drogas com atividade
antiparasitária / Letícia Mara Lima Angelini. - Rio Claro,
2016
47 f. : il., figs., tabs., quadros

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre

1. Microorganismos. 2. Nitrilase. 3. Nitrila hidratase. 4.
Amidase. 5. Mandelonitrila. I. Título.

Aos meus pais e à minha irmã, por todo amparo
concedido e confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Luís Humberto e Maria Helena, bem como à minha irmã Raíssa, por todo o apoio que me deram durante a minha graduação e por sempre acreditarem em meu potencial. Vocês me ensinaram a valorizar mesmo pequenas conquistas e sempre me incentivaram a batalhar cada vez mais.

Um agradecimento não menos importante às minhas queridas colegas Maria Júlia, Franciele e Mitra, que, independente da distância ou qualquer outro motivo, nunca deixaram de estar presentes na minha vida. Sou muito grata por poder chamá-las de amigas, e sei que independente de qualquer situação, a amizade entre nós sempre permanecerá. Vocês são pessoas que quero manter em minha vida para sempre. Sinto muito a falta de vocês.

Aos colegas do CBN10, saibam que tenho um carinho especial por todos vocês. Jamais vou esquecer os bons momentos tanto em sala de aula quanto fora dela. Infelizmente, não fui capaz de me graduar ao mesmo tempo que a maioria de vocês, mas me sinto lisonguada por ter sido lembrada com carinho durante as fotos da turma e durante a formatura.

Agradeço imensamente à minha orientadora Cintia Milagre e seu marido Humberto Milagre, por terem sido uma influência muito forte em minha formação como cientista. Sem dúvidas, vocês foram essenciais no desenvolvimento de meu pensamento crítico, além de terem sido, e ainda serem, exemplos de pesquisadores a serem seguidos. Ainda me lembro como vocês incentivavam os estudantes do laboratório a sempre buscar novas oportunidades e se enriquecerem cada vez mais intelectualmente. O período de um ano que passei no grupo de pesquisa de vocês abriu e continua a abrir muitos horizontes em minha carreira. Muito obrigada.

Agradeço também ao Professor Jonas Contiero, por ter acreditado na minha capacidade e ter me indicado à bolsa de Iniciação Científica com a professora Cintia.

À UNESP – Rio Claro, por toda a infraestrutura e pelo apoio acadêmico, ao departamento de Bioquímica e Microbiologia pelo espaço físico disponibilizado para realização deste trabalho, e a todos os funcionários da UNESP – Rio Claro, pelos serviços prestados.

Por fim, agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro concedido durante os doze meses de desenvolvimento do presente trabalho.

“Only those who attempt the absurd can achieve the impossible.”

Albert Einstein

RESUMO

O presente estudo avaliou o potencial de micro-organismos isolados da diversidade brasileira quanto à presença das enzimas nitrila hidratase (NHase)/amidase e/ou nitrilase (Nase), e sua capacidade de converter mandelonitrila em ácido mandélico e/ou mandelamida. Os micro-organismos foram isolados a partir de amostras de solo obtidas de duas localidades distintas. A primeira delas foi uma região da UNESP – Rio Claro que faz divisa com a FEENA (Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade), e a segunda localidade foi a Fecularia Plaza, uma usina de beneficiamento de mandioca na cidade de Santa Maria da Serra. Após o isolamento dos micro-organismos, os mesmos foram induzidos a produzirem as enzimas de interesse. Para avaliação do potencial enzimático dos micro-organismos selecionados, foi utilizado um ensaio colorimétrico em formato miniaturizado baseado em alterações de pH. Este ensaio foi uma modificação de um ensaio anterior, diferindo-se deste último pela presença do inibidor de amidase DEPA (dietilaminofosforamida), capaz de distinguir entre as rotas metabólicas da Nase e NHase/amidase. Foram avaliados 8 micro-organismos distintos por ensaio. Após incubação, foi observada a mudança de coloração do meio reacional pela leitura das placas por inspeção visual, com alteração da coloração azul (inicial) para verde claro ou amarelo, por exemplo. A partir deste ensaio, foi possível a seleção de 9 micro-organismos promissores para prosseguimento dos estudos. Foram obtidos alguns falsos-positivos, porém, estes foram identificados através de análises realizadas por GC-MS. Os 9 micro-organismos selecionados foram, então, utilizados em reações de transformação da mandelonitrila em escala um pouco maior (microtubos de 1,5 mL) comparada àquelas realizadas em microplaca de 96 poços (200 µl). Decorrido o tempo de reação, foram realizadas extrações da fase aquosa de cada microtubo e os produtos analisados por GC-FID em coluna RTX-5. Não foi detectada a formação dos compostos de interesse através deste método, nem mesmo a presença da mandelonitrila adicionada inicialmente ao ensaio. Uma provável hipótese é de que a mandelonitrila tenha sido incorporada pelas células microbianas e transformada em um composto que participa de alguma via metabólica do micro-organismo. Adicionalmente, foi testada a imobilização microbiana em alginato de sódio, que não se mostrou eficiente. Em relação aos indutores enzimáticos utilizados, aquele que se mostrou mais eficiente e mais estruturalmente similar à mandelonitrila – que, por sua vez, foi considerada bastante tóxica às células a ela expostas - foi a benzonitrila. Quanto à modificação do ensaio colorimétrico pela adição de DEPA, essa alteração levou a uma eficiente distinção entre as vias metabólicas da NHase/amidase e Nase no ensaio colorimétrico miniaturizado, sendo, portanto, considerado uma relevante contribuição em pesquisas que envolvam os sistemas enzimáticos em questão. As análises realizadas por GC-MS das reações de biotransformação da mandelonitrila também identificaram a provável presença de enzimas como álcool desidrogenase e oxinitrilases, que serão estudadas mais profundamente. Por fim, foi construída uma Coleção de Culturas Microbianas com os micro-organismos isolados a partir das amostras de solo, e estabeleceu-se um método adequado para a preservação dos mesmos a curto e médio prazos.

Palavras-chave: micro-organismos, nitrilase, nitrila hidratase, amidase, mandelonitrila, ensaio colorimétrico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Química verde, indústria farmacêutica e biocatálise.....	7
1.2 Biotransformação de nitrilas.....	8
1.3 Processos biocatalíticos.....	9
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Procedimentos gerais adotados.....	12
3.2 Reagentes e solventes.....	12
3.3 Coleta.....	12
3.3.1 Materiais.....	12
3.3.2 Procedimentos para realização da coleta.....	12
3.4 Seleção microbiana.....	13
3.4.1 Pesagem das amostras.....	13
3.4.2 Meio de cultura e soluções.....	13
3.4.2.1 Meio mínimo MM2.....	13
3.4.2.2 Solução de elementos traços.....	14
3.4.2.3 Solução de vitaminas.....	14
3.5 Enriquecimento das culturas.....	15
3.6 Isolamento dos micro-organismos.....	15
3.6.1 Procedimentos para as diluições seriadas.....	15
3.6.2 Plaqueamento das diluições seriadas e isolamento das colônias puras.....	16
3.6.3 Preservação dos micro-organismos a curto e médio prazos.....	16
3.6.3.1 Preparo das soluções de glicerol.....	17
3.7 Procedimentos para triagem enzimática.....	17
3.7.1 Ensaio enzimático com azul de bromotimol.....	18
3.7.2 Preparo da Solução Tampão Sørensen 10 mM pH 7.2.....	19
3.7.3 Preparo da solução tampão fosfato 10 mM acrescida de azul de bromotimol 0,01%.....	20
3.7.4 Preparo do meio para obtenção de biomassa.....	20
3.7.5 Preparo do meio para indução enzimática.....	21

3.8 Reação de transformação da mandelonitrila.....	21
3.9 Estudos cromatográficos.....	22
3.9.1 Cromatografia em camada delgada.....	22
3.9.1.1 Preparo da solução reveladora de ácido fosfomolibdico.....	23
3.9.1.2 Preparo da solução reveladora de verde de bromocresol.....	23
3.9.1.3 Preparo da solução reveladora de anisaldeído.....	23
3.9.2 Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC- FID).....	23
3.10 Preparo das esferas de alginato.....	24
3.10.1 Solução de alginato de sódio (2% m/v)	24
3.10.2 Solução de CaCl ₂ (0,2 mol/L)	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Coleta.....	26
4.1.1 Coleta do solo no campus da UNESP - Rio Claro.....	26
4.1.2 Coleta do solo da lagoa de decantação de água de manipueira.....	26
4.2 Isolamento dos micro-organismos.....	28
4.2.1 Isolamento de micro-organismos das amostras de solo coletadas no campus da UNESP – Rio Claro próximo à FEENA.....	28
4.2.2 Isolamento de micro-organismos das amostras coletadas da lagoa de decantação da água de manipueira da Fecularia Plaza.....	31
4.3 Preservação dos micro-organismos.....	31
4.3.1 Preservação a curto prazo.....	31
4.3.2 Preservação a médio prazo e verificação da viabilidade celular.....	32
4.4 Indução enzimática.....	32
4.5 Triagens enzimáticas.....	33
4.6 Reação de transformação da mandelonitrila.....	40
4.7 Imobilização: determinação do coeficiente de partição dos compostos.....	42
4.8 Estudo cromatográfico dos compostos.....	43
5. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química verde, indústria farmacêutica e biocatálise

Química verde é uma abordagem para a síntese, processamento e utilização de produtos químicos que reduz os riscos para os seres humanos e o meio ambiente. Muitos produtos químicos inovadores que foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos são eficientes e ambientalmente amigáveis. Estas abordagens incluem novas sínteses e processos, e também novas ferramentas para instruir os pesquisadores a como fazer a química de uma maneira ambientalmente viável. Os benefícios para a indústria, bem como para o meio ambiente, são todos parte do impacto positivo que a Química Verde está obtendo na comunidade química e na sociedade em geral (ANASTAS; WILLIAMSON, 1996).

A indústria farmacêutica atualmente necessita de rotas sintéticas ambientalmente sustentáveis, devido à regulamentação e ao cumprimento das exigências de economia de processos e especificação de produtos (WOODLEY, 2008). Também exige um desenvolvimento rápido que deve estar em paralelo com a química convencional e elevada pureza ótica para compostos complexos com múltiplos centros quirais (POLLARD; WOODLEY, 2006). Dessa forma, a biocatálise torna-se uma das tecnologias - juntamente com outros métodos catalíticos e novas rotas sintéticas - que pode contribuir para alcançar este objetivo, e, por esse motivo, continua a ganhar força e está se tornando um componente chave nos processos químicos.

Atualmente, os processos químicos nas indústrias farmacêuticas têm chamado a atenção para a aplicação da biocatálise utilizando enzimas isoladas, ou mais comumente, enzimas imobilizadas ou células íntegras como catalisadores. As propriedades seletivas de enzimas permitem que elas possam ser utilizadas para criar novos centros quirais via reações assimétricas, sendo uma estratégia eficaz para a criação de moléculas opticamente puras, as quais são essenciais para a fabricação de muitos fármacos (POLLARD; WOODLEY, 2006). Assim, a participação de enzimas na síntese química neste contexto tem muitas vantagens, incluindo o fato de evitar etapas de proteção/desproteção devido não somente às enzimas apresentarem alta seletividade, mas também operarem sob condições amenas de temperatura e pressão. O

reconhecimento dos benefícios da seletividade da biocatálise tem resultado na introdução de um número significativo de reações biocatalíticas na síntese de novos fármacos, e na substituição de processos até mesmo para aqueles que já estão no mercado ou em desenvolvimento (WOODLEY, 2008).

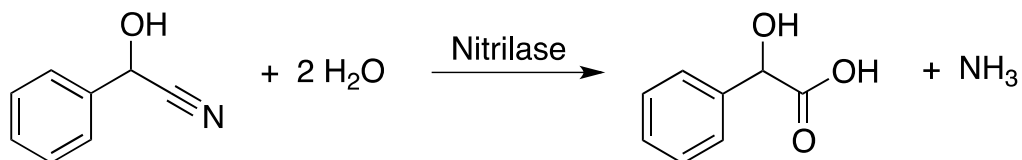
1.2 Biotransformação de nitrilas

Nitrilas são consideradas de importância sintética devido à facilidade com que podem ser obtidas e também transformadas em amidas e/ou ácidos carboxílicos de alto valor sintético. As enzimas que catalisam a transformação de nitrilas, denominadas nitrilases (Nases, EC3.5.5.1.), nitrila hidratases (NHases, EC 4.2.1.84) e amidases (EC 3.5.1.4), fornecem vias para a hidrólise de nitrilas, por serem altamente seletivas e exibirem alta atividade (BANERJEE; SHARMA; BANERJEE, 2002; BANERJEE et al., 2003).

A hidrólise química de nitrilas usualmente requer condições reacionais severas (como a utilização de ácidos ou bases fortes a altas temperaturas) que podem causar racemização e/ou decomposição de grupos funcionais da molécula, além de frequentemente apresentar baixos rendimento, regio-, quimio- e estereosseletividade, e contribuir para o impacto ambiental (CANTARELLA et al., 2006). Por esse motivo, a utilização de micro-organismos no desenvolvimento de biotransformações de nitrilas é uma alternativa viável em relação à hidrólise química, devido à habilidade de alguns em produzir grandes quantidades de biomassa, resultando em grandes quantidades da enzima de interesse em um curto espaço de tempo, e também à quimio-, regio- e enantiosseletividade dessas enzimas (LERESCHE; MEYER, 2006).

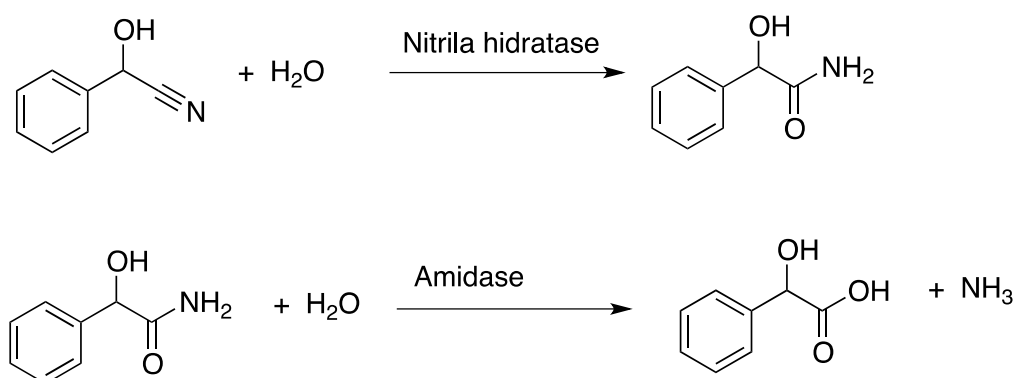
A biotransformação de nitrilas mediada por micro-organismos pode ocorrer por duas principais vias enzimáticas: pela via da nitrilase, a qual hidrolisa as nitrilas diretamente nos ácidos carboxílicos correspondentes e amônia, como mostrado no Esquema 1 e pela via das nitrila hidratases / amidase, onde primeiramente, as nitrilas são hidratadas e formam as amidas correspondentes pela ação da nitrila hidratase; após esta etapa, as amidas formadas são hidrolisadas nos correspondentes ácidos carboxílicos e amônia pela amidase, como descrito no Esquema 2 (KOBAYASHI et al., 1993).

Esquema 1 - Via da nitrilase, transformando uma molécula de mandelonitrila diretamente em ácido mandélico e amônia.



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

Esquema 2 - Via das nitrila hidratases/amidases. Primeiramente, a mandelonitrila é hidratada pela ação da nitrila hidratase, formando uma mandelamida. Essa amida é hidrolisada por uma amidase, formando ácido mandélico e amônia.



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

Processos biocatalíticos utilizando NHases microbianas já têm sido utilizados com sucesso para produção industrial em escala multi-tonelada de diversos compostos, como acrilamida (Mitsubishi-Rayon) e nicotinamida (Lonza) (PATEL, 1992).

1.3 Processos biocatalíticos

Em micro-organismos selvagens, as enzimas que transformam nitrilas frequentemente requerem um passo de indução (FOURNAND; ARNAUD, 2001). Os processos de biotransformação de nitrilas e amidas catalisados por células totais têm produzido uma gama de compostos e intermediários químicos, com aplicações em indústrias, bem como na fabricação de suplementos nutricionais, fármacos, plásticos,

adesivos, tintas (VELANKAR et al., 2010). Os ácidos carboxílicos produzidos por biotransformações catalisadas por micro-organismos são, muitas vezes, precursores de numerosos compostos com atividade biológica utilizados pela indústria farmacêutica (LEUCHTENBERGER; HUTHMACHER; DRAUZ, 2005).

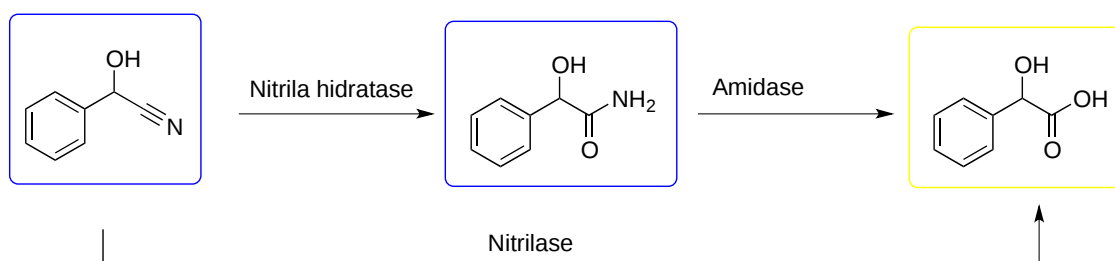
Particularmente, a imobilização de células ou enzimas tem sido bastante utilizada nos processos biocatalíticos, pois facilita as estratégias de um processo contínuo com a retenção do biocatalisador e simultânea remoção do produto. Frequentemente, a imobilização também pode melhorar a estabilidade do biocatalisador, além de ter sido relatado que algumas células, quando imobilizadas, são capazes de catalisar substratos nitrilados em altas concentrações, se comparadas às células livres (DIAS; REZENDE; LINARDI, 2001).

O aprisionamento de enzimas por matrizes tais como carragenana, alginatos de cálcio e bário, dietilaminoetil (DEAE), celulose, poliacrilamida, por exemplo, têm sido usados extensivamente para imobilização de células que degradam nitrilas (GUO et al., 2006). Alginato e ágar são os métodos mais comuns para aprisionamento de células em processos de degradação de nitrilas e têm frequentemente mostrado notável retenção da atividade biocatalítica (provavelmente devido às condições moderadas de imobilização) e, portanto, exibindo efetiva bioconversão do substrato por múltiplos ciclos de reação (YURYEV; LIESE, 2010).

2 OBJETIVO

Avaliar o potencial enzimático em relação à presença de nitrila hidratases, amidases e nitrilases (Esquema 3) em micro-organismos isolados da diversidade brasileira para a biotransformação da mandelonitrila.

Esquema 3 - Transformações enzimáticas da mandelonitrila catalisadas pelas enzimas nitrila hidratase, amidase e nitrilase.



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais adotados

Todos os materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C, 1,5 KPa por 20 min, seguidos de secagem em estufa, no caso das vidrarias.

Para o descarte ou reaproveitamento de materiais que entraram em contato direto com micro-organismos, foi realizada a esterilização também em autoclave.

Para esterilização de bancadas, foi utilizado álcool 70% e, para o fluxo laminar, também a luz U.V., de forma a minimizar possíveis contaminações.

3.2 Reagentes e solventes

Os reagentes mandelonitrila, mandelamida, ácido mandélico e DEPA foram obtidos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes e solventes foram de grau P.A.

3.3 Coleta

3.3.1 Materiais

Nas coletas realizadas na UNESP, foram utilizadas 2 espátulas autoclavadas para coletar as amostras de solo, caixa térmica para armazenar as amostras coletadas, 2 sacos para coleta estéreis, 2 pares de luvas, pisseta com etanol 70%, caneta permanente para identificação das amostras, lápis e caderno para anotações, GPS e máquina fotográfica.

Nas coletas realizadas na Fecularia Plaza, utilizou-se 4 espátulas autoclavadas, 4 sacos para coleta estéreis, 4 pares de luvas, e os mesmos outros materiais utilizados na primeira coleta.

3.3.2 Procedimentos para realização da coleta

A utilização de luvas foi importante para que as amostras não entrassem em contato direto com o coletor, evitando, assim, a contaminação humana das amostras. Cerca de 5g de solo foram coletados em cada ponto especificado com o auxílio das espátulas, colocados nos respectivos sacos para coleta estéreis e identificados. As amostras foram armazenadas na caixa térmica até a chegada ao laboratório. Com o auxílio do GPS, foram anotadas as coordenadas geográficas de cada ponto coletado e com a máquina fotográfica, foram registrados os pontos de coleta.

3.4 Seleção microbiana

3.4.1 Pesagem das amostras

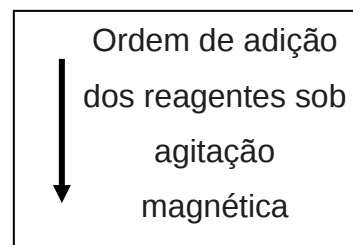
Foram pesados aproximadamente 1g de cada amostra de solo coletada, sob condições estéreis.

3.4.2 Meio de cultura e soluções

3.4.2.1 Meio mínimo MM2

Preparou-se 100 mL de meio mínimo definido (MM2) em frasco Schott de 250 mL. Após o preparo do meio, foram transferidos 25 mL para 4 erlenmeyers e autoclavou-se o meio. O meio MM2 apresenta a seguinte composição:

FeCl ₃ x 6 H ₂ O -----	0,08 g/L
CaCl ₂ -----	0,05 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O -----	0,02 g/L
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O -----	4 g/L
KH ₂ PO ₄ -----	2 g/L
Glicose -----	1,8 g/L



Após autoclavagem e resfriamento do meio sob temperatura ambiente, foram adicionadas as soluções de elementos traços e de vitaminas (25 µL de cada), além do indutor enzimático (para a mandelonitrila, 25 µL; para acetonitrila, 160 µL).

3.4.2.2 Solução de elementos traços

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -----	0,1 g/L
$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ -----	0,0062 g/L
H_3BO_3 -----	0,03 g/L
CuSO_4 -----	0,001 g/L
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -----	0,02 g/L
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -----	0,002 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -----	0,003 g/L

Foi autoclavado 1L de água deionizada para preparo desta solução. Após o resfriamento da água a temperatura ambiente, no fluxo laminar previamente esterilizado, os reagentes foram adicionados e, após a solubilização dos mesmos, 250 mL da solução foi alíquotada para um frasco Schott de 250 mL estéril. Tanto a solução estoque quanto a alíquota foram protegidas da luz e armazenadas em geladeira.

3.4.2.3 Solução de vitaminas

Solução de biotina-----	1 mL
pantotenato de cálcio-----	0,1 g
ácido nicotínico-----	0,1 g
(meso) inositol-----	2,5 g
hidroclorato de tiamina-----	0,1 g

Esterilizou-se 10 mL de água deionizada em um tubo Falcon de 14 mL. Com esta água estéril, preparou-se 10 mL de uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L. Adicionou-se 0,05 g de biotina e o pH foi ajustado para 6,5 com solução aquosa de HCl. Todo o procedimento foi realizado no fluxo laminar. A solução foi armazenada em geladeira.

Foram autoclavados 100 mL de água deionizada para preparo desta solução. Após o resfriamento da água a temperatura ambiente, os reagentes foram adicionados e, após a solubilização total, a solução foi protegida da luz e armazenada em geladeira.

3.5 Enriquecimento das culturas

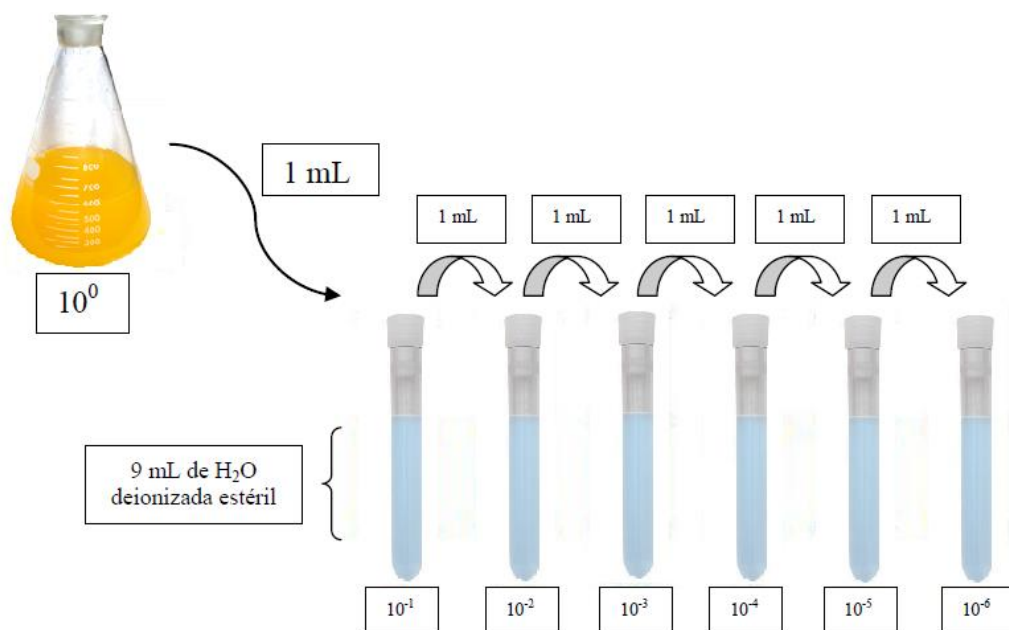
Para a primeira ativação, 1 g de cada amostra de solo foi pesado e inoculado em erlenmeyer contendo 25 mL de meio MM2 acrescido de solução de elementos traços e de vitaminas, além do indutor. Incubou-se o erlenmeyer em shaker a 30 °C, 140 rpm, por 3 dias. Após este período, realizou-se a segunda ativação, retirando alíquota de 1000 µL de cada amostra e transferindo para o mesmo meio MM2, conforme descrito anteriormente. Foram incubados nas mesmas condições que a primeira ativação. Este processo se repetiu por mais 1 vez, totalizando 3 ativações.

3.6 Isolamento dos micro-organismos

3.6.1 Procedimentos para as diluições seriadas

Foram esterilizados 9 tubos tipo Falcon, contendo 9 mL de água deionizada cada. Ao primeiro tubo foi adicionado 1 mL do inóculo de solo enriquecido e esta suspensão foi homogeneizada. Foi transferido para o segundo tubo Falcon 1 mL desta suspensão e homogeneizou-se. Este procedimento foi realizado com os 9 tubos Falcon, sendo que no último tubo, 1 mL da suspensão foi descartado após homogeneização. Assim foram produzidos 6 inóculos diluídos seriadamente (10^0 a 10^{-6}), como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da diluição seriada realizada.



Fonte: Representação esquemática elaborada pela autora.

3.6.2 Plaqueamento das diluições seriadas e isolamento das colônias puras

Preparou-se meio MM2, e nele foi acrescentado 1,5% de ágar-ágar e autoclavou-se. O meio foi vertido em placas de Petri estéreis e aguardou-se sua solidificação. De cada inóculo diluído retirou-se uma alíquota de 200 μ L e a plaqueou, através da técnica de semeadura por espalhamento pela superfície do ágar com auxílio da alça de Drigalski descartável. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C por cerca de 10 dias.

Após o crescimento das colônias, foi realizado o isolamento dos microorganismos com o auxílio da alça de platina, em placa de Petri contendo meio MM2 sólido (1,5% de ágar) estéril, através da técnica de estrias de esgotamento para a obtenção de culturas puras. Para a esterilização da alça, foi utilizado esterilizador de infravermelho. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C por cerca de 10 dias.

3.6.3 Preservação dos micro-organismos a curto e médio prazos

Para preservação a curto prazo, adicionou-se 5 mL de meio NB acrescido de 1,5% de ágar-ágar em tubos de ensaio. Os tubos foram autoclavados e depois inclinados até a solidificação do meio. Cada cultura pura que havia sido isolada em placa de Petri

foi transferida com o auxílio de uma alça de inoculação, previamente esterilizada em esterilizador infravermelho, pela técnica de estriamento em superfície para dois tubos de ensaio com ágar inclinado. Os tubos foram levados para a B.O.D. por 24 horas a 30 °C. Após verificação do crescimento microbiano, os tubos foram armazenados no refrigerador a 4 °C.

Para a preservação a médio prazo, foram utilizados microtubos de 1,5 mL, onde foram adicionados aproximadamente 0,5 mL de meio NB acrescido de ágar-ágar autoclavado. Os microtubos foram inclinados até a solidificação do meio. Foram preparadas soluções aquosas de glicerol 10%, 20% e 30%.

Para cada micro-organismo foram separados 6 microtubos com ágar inclinado para que fosse realizada a preservação. Os micro-organismos foram transferidos para os microtubos pela técnica de estriamento superficial utilizando a alça de inoculação, e estes foram incubados na B.O.D. por 24 horas a 30 °C. Após verificação do crescimento microbiano, foram adicionadas em duplicatas as soluções de glicerol 10%, 20% e 30%, num volume suficiente para cobrir todo o ágar. Os microtubos foram armazenados no superfreezer a -20 °C.

3.6.3.1 Preparo das soluções de glicerol

- a) Solução de glicerol 10%: 90 mL de água deionizada autoclavada + 10 mL de glicerol.
- b) Solução de glicerol 20%: 80 mL de água deionizada autoclavada + 20 mL de glicerol.
- c) Solução de glicerol 30%: 70 mL de água deionizada autoclavada + 30 mL de glicerol.

As soluções foram preparadas no fluxo laminar sob condições estéreis e depois protegidas da luz e armazenadas em geladeira.

3.7 Procedimentos para triagem enzimática

Cada micro-organismo que estava armazenado em geladeira foi inoculado em um erlenmeyer contendo 50 mL de meio para obtenção de biomassa estéril e incubado por 24h a 160 rpm e 30 °C. Após o crescimento, 8% da cultura obtida (4 mL) foram transferidos para um novo erlenmeyer e o volume completado para 50 mL com meio

para indução contendo benzonitrila como indutor enzimático. O erlenmeyer foi levado ao shaker sob agitação de 160 rpm a 30 °C por 24h.

Após observação do crescimento microbiano, foi realizada a suspensão celular a 200 mg de células/1 mL de tampão. Foram pesados tubos Falcon de 50 mL estéreis e vazios e identificados. Em cada tubo, uma cultura obtida da indução microbiana foi adicionada e centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante, desprezado. A massa celular obtida no fundo do tubo foi lavada com 10 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,2 (pKa 7,2) e os tubos, centrifugados novamente por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, pesou-se os tubos Falcon e anotou-se a massa obtida. Ao final do processo, foram adicionadas as quantidades de tampão fosfato 10 mM pH 7,2 (pKa 7,2) necessárias para que as suspensões de células apresentassem a mesma concentração de 200 mg/mL, e os tubos foram agitados no vórtex para homogeneização da suspensão.

Foram também preparadas soluções estoque de mandelonitrila 500 mM, mandelamida 500 mM, ácido mandélico 500 mM e DEPA 200 mM, todas etanólicas.

O ensaio colorimétrico foi realizado em microplaca de 96 poços, e cada ensaio foi feito em triplicata, sendo volume final de cada um dos poços de 200 µL. As microplacas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 160 rpm por uma semana, e todos os dias havia o acompanhamento dos ensaios e registro fotográfico. O protocolo utilizado para a montagem das microplacas está contido no item 3.7.1.

3.7.1 Ensaio enzimático com azul de bromotimol

Volume final = 200 µL

a) Controle microbiano

20 µL de suspensão celular e 180 µL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

b) Ensaio com DEPA

20 µL de suspensão celular, 6 µL de solução etanólica de mandelonitrila 500 mM, 10 µL de DEPA 200 mM e 164 µL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

c) Ensaio sem DEPA

20 μL de suspensão celular, 6 μL de solução etanólica de mandelonitrila 500 mM e 174 μL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

d) Controle mandelonitrila

6 μL de solução etanólica de mandelonitrila 500 mM e 194 μL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

e) Controle mandelamida

6 μL de solução etanólica de mandelamida 500 mM e 194 μL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

f) Controle DEPA

6 μL de solução etanólica de DEPA 200 mM e 194 μL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

g) Controle ácido mandélico

6 μL de solução etanólica de ácido mandélico 500 mM e 194 μL tampão 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

3.7.2 Preparo da Solução Tampão Sørensen 10 mM pH 7.2

A solução tampão pH 7,2 10 mM foi preparada a partir de uma solução tampão pH 7,2 100 mM e autoclavada. Para o preparo da solução tampão pH 7,2 100 mM seguiu-se às indicações da Tabela 1 acrescentado-se igual volume de água deionizada autoclavada ao final.

Tabela 1 - Volumes necessários da solução A e B e respectivos valores de pH para preparo da solução tampão Sørensen.

A (mL)	B (mL)	pH
92,0	8,0	5,8
87,7	12,3	6,0

81,5	18,5	6,2
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2
23,0	77,0	7,3
19,0	81,0	7,4
16,0	84,0	7,5
8,5	91,5	7,8
5,3	94,7	8,0

Fonte: Tabela elaborada pela autora.

Solução estoque: A: 0,2 M NaH_2PO_4 ; B: 0,2 M Na_2HPO_4 .

3.7.3 Preparo da solução tampão fosfato 10 mM acrescida de azul de bromotimol 0,01%

Preparou-se 15 mL de solução tampão fosfato 10 mM + azul de bromotimol 0,01% adicionando 0,0015 g de Azul de Bromotimol em 15 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,2. A solução foi autoclavada.

3.7.4 Preparo do meio para obtenção de biomassa

Peptona-----10 g/L

NaCl-----3 g/L

Glicose-----10 g/L

Extrato de levedura-----5 g/L

KH_2PO_4 -----	2 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,2 g/L
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,03 g/L
Solução de elementos traços----	0,1% v/v

Os reagentes foram adicionados em 800 mL de água deionizada em frasco Schott de 900 mL sob agitação magnética. Após a solubilização de todos os reagentes, o meio de cultura foi autoclavado. Aguardou-se o resfriamento do meio para que fossem adicionados 800 μL de solução de elementos traços. O meio foi armazenado em geladeira.

3.7.5 Preparo do meio para indução enzimática

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -----	4 g/L
KH_2PO_4 -----	2 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,2 g/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ -----	0,03 g/L
Extrato de levedura-----	3 g/L
Glicose-----	7 g/L
Peptona-----	7 g/L
NaCl -----	1 g/L
Solução de elementos traços----	0,1% v/v
Indutor (Benzonitrila)-----	0,1% v/v

Foram preparados 800 mL de meio, em frasco Schott de 900 mL sob agitação magnética. Após a solubilização de todos os reagentes, o meio de cultura foi autoclavado e aguardou-se o resfriamento do mesmo para que fossem adicionados 800 μL de solução de elementos traços e 800 μL de benzonitrila. O meio foi armazenado em geladeira.

3.8 Reação de transformação da mandelonitrila

O mesmo procedimento para o crescimento e ativação das células realizado para o preparo da suspensão celular 200 mg/mL utilizada no ensaio enzimático foi realizado. Porém, a suspensão preparada para esta reação continha 100 mg de células para cada 1,14 mL de tampão a 100 mM pH 7,2. Além disso, foram preparados 2 mL de uma solução estoque de mandelonitrila e etanol 200 mM para montagem da reação.

A reação de transformação foi preparada em microtubos de 1,5 mL estéreis, e continha 1,14 mL de suspensão celular e 60 μ L da solução estoque de mandelonitrila 200 mM, com volume final de 1,2 mL.

Os microtubos foram levados para o Mixing Block, a temperatura de 30 °C e agitação de 1000 rpm por 48h. Transcorrido o tempo determinado, os microtubos contendo a reação foram centrifugados em minicentrífuga por 10 minutos a 10000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e as células, desprezadas. Foram realizadas as extrações dos sobrenadantes (fase aquosa), tanto em pH ácido (próximo de 2, ajustado com solução de HCl 2M) quanto em pH básico (próximo de 12, ajustado com solução de NaOH 2M), com acetato de etila. As fases orgânicas provenientes da extração das fases aquosas foram secadas sobre MgSO₄ e evaporadas a vácuo em rotaevaporador a 30 °C.

Após a evaporação das amostras, as mesmas foram solubilizadas em 0,5 mL de metanol e transferidas para microtubos de 2 mL. A mesma quantidade de BF₃ foi adicionada. Os microtubos foram levados ao Mixing Block por 10 minutos a 60 °C e agitação de 1000 rpm. Transcorrido o tempo de reação, os microtubos foram resfriados em gelo por cerca de 10 minutos e algumas gotas de água deionizada foram adicionadas para que a reação de derivatização cessasse. As reações foram, então, extraídas com acetato de etila como descrito anteriormente, solubilizadas em acetato de etila e transferidas para frascos VIAL de 1 mL para análise em GC-FID.

As extrações foram analisadas por GC-FID em coluna RTX-5. Os cromatogramas gerados foram analisados.

3.9 Estudos cromatográficos

3.9.1 Cromatografia em camada delgada

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em U.V. 254nm. Para a fase móvel dos compostos mandelonitrila e ácido mandélico foram empregados os eluentes hexano e acetato de etila na proporção de 3:1. Para a mandelamida, utilizou-se acetato de etila 100%.

Os compostos a serem estudados foram solubilizados em etanol, exceto a mandelamida, que foi solubilizada em acetato de etila. As placas foram reveladas em câmara UV, no comprimento de onda 264 nm. Quando utilizado o vapor de iodo, as placas foram deixadas por 5 minutos, e nas soluções reveladoras de Ácido Fosfomolibdico, Verde de Bromocresol e Anisaldeído, foram imersas em cada solução e depois aquecidas com pistola aquecedora para secagem e visualização.

3.9.1.1 Preparo da solução reveladora de ácido fosfomolibdico

Adicionou-se 5 g de ácido fosfomolibdico a 75 mL de etanol P.A. Protegeu-se a solução da luz.

3.9.1.2 Preparo da solução reveladora de verde de bromocresol

Adicionou-se 0,1 g de verde de bromocresol em 500 mL de etanol e 5 mL de solução aquosa de NaOH 0,1 M. A solução foi protegida da luz.

3.9.1.3 Preparo da solução reveladora de anisaldeído

Misturou-se 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de H₂SO₄ a 98% v/v, nesta ordem e sob resfriamento.

3.9.2 Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID)

As análises por GC-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo GC 2010 Plus AF - Shimadzu acoplado a um detector de ionização de chamas.

Foram utilizadas uma coluna capilar com fase 5% difenil/95% dimetil-polisiloxano, modelo Rtx-5 (Restec) e coluna capilar com fase Polietilenoglicol (Carbowax), modelo Rtx-Wax (Restec), ambas com as dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm. O cromatógrafo operou a pressão constante de 65 KPa de gás H₂ de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 230 °C e a temperatura do detector a 240 °C. As amostras foram injetadas no modo de injeção automática, no volume de 1 µL e concentração de 0,5 – 1 mg / mL.

3.10 Preparo das esferas de alginato

Em um frasco tipo Schott, foram preparados 250 mL de solução de alginato de sódio (2% m/v) sob agitação magnética. Em um erlenmeyer de 900 mL, foram preparados 700 mL de solução de Cloreto de Cálcio (0,2 mol/L), também sob agitação.

3.10.1 Solução de alginato de sódio (2% m/v)

Alginato de sódio-----5 g
Água deionizada-----250 mL

3.10.2 Solução de CaCl₂ (0,2 mol/L)

CaCl₂-----15,54 g
Água deionizada-----700 mL

As esferas foram preparadas utilizando a bomba peristáltica, sendo a solução de alginato extrudada na solução de CaCl₂ (sob agitação) com o auxílio de uma bomba dosadora peristáltica, uma extrusora e uma agulha de seringa (Figura 2). As esferas obtidas foram deixadas por 30 minutos em repouso na solução de CaCl₂ e depois lavadas 3 vezes com água destilada para posterior utilização.

Figura 2 - Sistema para preparo das esferas de alginato.



Fonte: Foto obtida pela autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta

4.1.1 Coleta do solo no campus da UNESP - Rio Claro

Foram coletadas amostras de solo de dois diferentes pontos numa área da UNESP - Rio Claro que faz divisa com a FEENA (Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade), uma área que visa o manejo sustentável dos recursos, e é, também, de proteção ambiental, cujo solo não sofreu ação antrópica. As amostras foram coletadas nessa área com o intuito de avaliar se os micro-organismos presentes seriam capazes de degradar compostos nitrilados, mesmo que estivessem adaptados a viver num solo virgem.

A Tabela 2 mostra as coordenadas geográficas dos 2 diferentes pontos de coleta.

Tabela 2 - Pontos de coleta realizada no Campus da UNESP próximo à divisa com a FEENA, na cidade de Rio Claro – SP.

Identificação	Coordenada Geográfica
Ponto de coleta 1	S 22° 23' 562'' W 047° 32' 401'' Altitude: 584m
Ponto de coleta 2	S 22° 23' 794'' W 047° 32' 551'' Altitude: 613m

Fonte: Tabela elaborada pela autora.

S – latitude sul; N – latitude norte; W – longitude oeste; E – longitude leste; Altitude – em relação ao nível do mar.

4.1.2 Coleta do solo da lagoa de decantação de água de manipueira

Foram coletadas amostras de solo em quatro diferentes pontos próximo à lagoa de decantação de água de manipueira da Fecularia Plaza, uma usina de beneficiamento

da mandioca, localizada na cidade de Santa Maria da Serra (Figura 3). A Tabela 3 mostra as coordenadas geográficas dos 4 diferentes pontos de coleta.

Figura 3 - Lagoa de decantação de água de manipueira, em Santa Maria da Serra.



Fonte: Foto obtida pela autora.

Tabela 3 - Pontos de coleta realizada na Fecularia Plaza, em Santa Maria da Serra – SP.

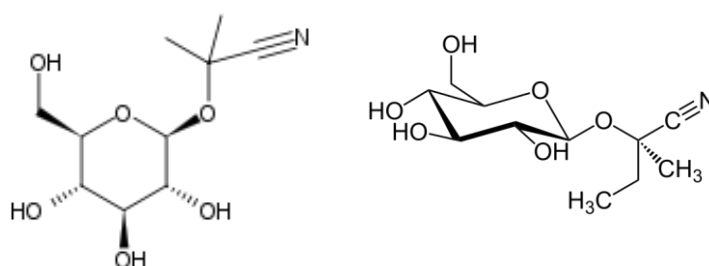
Identificação	Coordenada Geográfica
Ponto de coleta 1	S 22° 34' 022'' W 048° 09' 378'' Altitude: 495m
Ponto de coleta 2	S 22° 34' 022'' W 048° 09' 380'' Altitude: 495m
Ponto de coleta 3	S 22° 34' 021'' W 048° 09' 379'' Altitude: 495m
Ponto de coleta 4	S 22° 34' 021'' W 048° 09' 380'' Altitude: 495m

Fonte: Tabela elaborada pela autora.

S – latitude sul; N – latitude norte; W – longitude oeste; E – longitude leste; Altitude – em relação ao nível do mar.

O motivo da coleta nesse local foi devido ao fato de a mandioca pertencer ao grupo de plantas cianogênicas que apresentam glicosídeos cianogênicos como parte de seu metabolismo, como a linamarina e a lotaustralina (Figura 4). Assim, os micro-organismos capazes de crescer em solos contendo estes compostos provavelmente já seriam pré-selecionados naturalmente quanto à capacidade de metabolizar nitrilas.

Figura 4 - Alguns glicosídeos cianogênicos presentes na mandioca: linamarina (esquerda) e lotaustralina (direita).



Fonte: Google imagens.

4.2 Isolamento dos micro-organismos

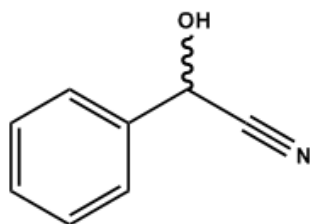
4.2.1 Isolamento de micro-organismos das amostras de solo coletadas no campus da UNESP – Rio Claro próximo à FEENA

Foi realizado um experimento controle contendo meio NB (Nutrient Broth) e 2g de solo. O experimento controle foi incubado a 30 °C e 100 rpm, por uma semana. Verificou-se que a turbidez do meio estava muito elevada, devido ao material particulado do solo. A densidade microbiana foi avaliada através do plaqueamento de uma alíquota do experimento controle em meio NA (Nutrient Ágar). Após incubação das placas de Petri inoculadas, verificou-se um acentuado crescimento de diversos tipos de colônias, comprovando a grande densidade microbiana contida no solo.

O isolamento de micro-organismos foi primeiramente realizado pela técnica de enriquecimento em meio líquido, que propicia um grande aumento de determinadas populações microbianas presentes na amostra. A técnica consistiu de inoculação de

amostras de solo em um meio mínimo contendo mandelonitrila (Figura 5) como a única fonte de Nitrogênio disponível (funcionando como um agente seletivo). Este elemento químico é muito importante para os micro-organismos, pois é necessário para a síntese de muitas biomoléculas, como os ácidos nucleicos e proteínas, sendo considerado um dos macronutrientes essenciais. Após o crescimento dos micro-organismos neste meio líquido, foi realizada a transferência de alíquotas do inóculo da cultura obtida para um novo meio líquido, recém preparado, de mesma composição com a finalidade de selecionar os micro-organismos viáveis e potencialmente capazes de metabolizar a mandelonitrila, ou sobreviver na presença da mesma. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes.

Figura 5 - Mandelonitrila, composto utilizado para a indução dos micro-organismos.



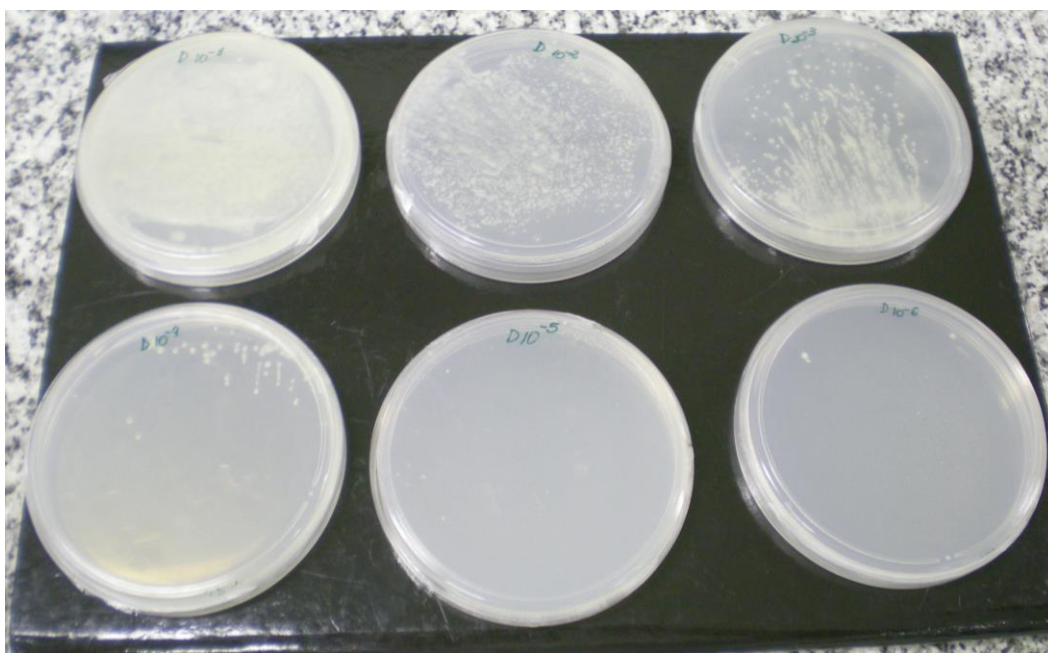
Fonte: Estrutura elaborada pela autora.

Após realização da etapa de enriquecimento, foram realizadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) das culturas obtidas. Cada diluição foi plaqueada em meio mínimo (MM2, ver descrição da composição do meio na parte experimental) + ágar-ágar enriquecido com mandelonitrila, através da técnica de semeadura por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 30 °C.

Após observado o crescimento das colônias (Figura 6), as mesmas foram diferenciadas e selecionadas pelas suas características morfológicas macroscópicas, tais como: tamanho da colônia (pequena, média ou grande), forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizóide, fusiforme), elevação (plana, elevada, convexa, pulviniforme, umbonada), bordas (inteira, ondulada, lobada, denteada-irregular, filamentosa, encrespada), cromogênese (pigmentada ou sem pigmento), detalhe óptico (transparente, translúcida, opaca, brilhante), superfície (lisa, rugosa, mucosa, seca, pulverulenta). Priorizou-se a seleção de cepas de bactérias e leveduras, uma vez que o

meio utilizado para isolamento, Nutrient Broth, é bastante favorável para o crescimento das mesmas. Fungos filamentosos não foram selecionados, pois nas etapas seguintes dos estudos, tais como a imobilização dos micro-organismos, eles não seriam interessantes, devido à dificuldade de imobilização dos micélios.

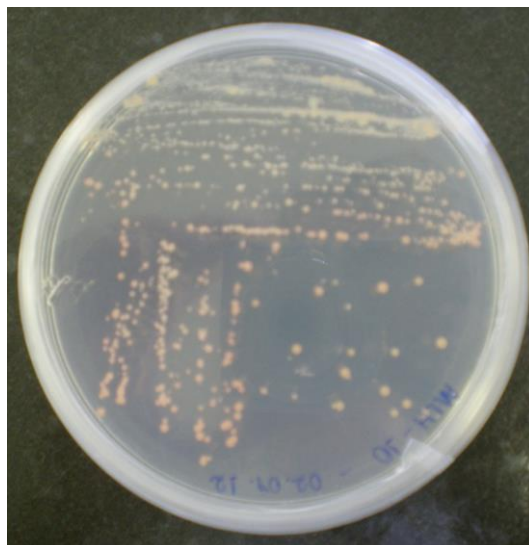
Figura 6 - Placas de Petri com as colônias obtidas a partir das diluições seriadas, de 10^{-1} a 10^{-6} .



Fonte: Foto obtida pela autora.

O isolamento das colônias pré-selecionadas se deu pela técnica de estrias de esgotamento em meio sólido para obtenção das colônias puras (Figura 7). Ao fim do isolamento, foram selecionados 4 micro-organismos diferentes para utilização durante os estudos. Provavelmente, o número reduzido de micro-organismos isolados em relação à grande densidade de micro-organismos do experimento controle se deve ao fato da grande toxicidade da mandelonitrila para as células microbianas.

Figura 7 - Colônias puras obtidas pela técnica de estrias de esgotamento.



Fonte: Foto obtida pela autora.

4.2.2 Isolamento de micro-organismos das amostras coletadas da lagoa de decantação da água de manipueira da Fecularia Plaza

O mesmo procedimento descrito acima para isolamento dos micro-organismos foi realizado para estas amostras, porém, o composto nitrilado utilizado para as induções enzimáticas foi a acetonitrila. Ao fim do isolamento, foram selecionados 12 micro-organismos diferentes.

4.3 Preservação dos micro-organismos

4.3.1 Preservação a curto prazo

A preservação a curto prazo é de grande importância durante os estudos, pois os micro-organismos ficam acessíveis para uso imediato, sendo que, após serem utilizados, já podem ser repicados em um novo tubo com ágar inclinado e os tubos antigos descartados, com o intuito de minimizar possíveis contaminações. Além disso, nesta técnica o manuseio é bastante simples, além de não requerer altos custos para a manutenção, nem mesmo equipamentos específicos. O objetivo da preservação a curto prazo é reduzir o metabolismo dos micro-organismos, para que ainda estejam viáveis em até seis meses armazenados em geladeira.

Cada micro-organismo isolado nas placas de Petri por estrias de esgotamento foi transferido em duplicata para tubos contendo ágar inclinado, através da técnica de estriamento em superfície. Verificado o crescimento dos micro-organismos, estes foram armazenados em geladeira, a 4 °C.

4.3.2 Preservação a médio prazo e verificação da viabilidade celular

Para a preservação a médio prazo, soluções aquosas de glicerol em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%) foram utilizadas. O glicerol é um agente crioprotetor que impede a formação de cristais de gelo dentro das células microbianas, evitando, assim, que suas paredes celulares sejam rompidas. Para cada solução de glicerol, foram feitos microtubos em duplicata para a preservação dos micro-organismos. Os micro-organismos foram transferidos para os microtubos com ágar inclinado pela técnica de estriamento superficial utilizando a alça de inoculação e mantidos em B.O.D. a 30 °C. Após verificação do crescimento microbiano, foram adicionadas, em duplicatas, as soluções de glicerol 10%, 20% e 30%, num volume suficiente para cobrir todo o ágar. Os microtubos foram armazenados no superfreezer a -20 °C.

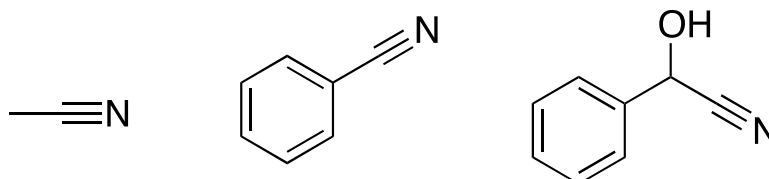
Após 6 meses estocados em superfreezer, foi realizada a verificação da viabilidade celular dos micro-organismos em glicerol (10%, 20% e 30%), para que fosse determinada qual seria a melhor concentração de solução a ser utilizada para a preservação. Foi verificado que todos os micro-organismos tiveram ótimo crescimento independente da concentração de glicerol em que foram armazenados.

4.4 Indução enzimática

As enzimas de interesse deste trabalho (nitrilases, nitrila hidratases e amidases) são, em sua maioria, indutivas, ou seja, necessitam de determinadas substâncias - os indutores enzimáticos - que, quando presentes, estimulam as células a produzirem essas enzimas. Além disso, sabe-se que as NHases também dependem de cofatores como o Fe e o Cu, e, portanto, estes elementos devem estar presentes no meio de cultura a ser utilizado durante as ativações dos micro-organismos. Assim, foram testados três

diferentes indutores enzimáticos: acetonitrila (uma nitrila alifática), benzonitrila e mandelonitrila (ambas nitrilas aromáticas) (Figura 8).

Figura 8 - Estruturas químicas da acetonitrila, benzonitrila e mandelonitrila, compostos nitrilados utilizados como indutores enzimáticos.



Fonte: Estruturas elaboradas pela autora.

A partir das induções enzimáticas realizadas, foi observado que a mandelonitrila não foi um bom indutor enzimático. Observou-se baixa densidade celular nas culturas em meio líquido contendo mandelonitrila devido à sua alta toxicidade para as células. Bons resultados foram obtidos com as induções realizadas em presença de acetonitrila e também com a benzonitrila. A benzonitrila foi considerada o melhor indutor a ser utilizado nas etapas seguintes dos experimentos por ser uma nitrila aromática tal como a mandelonitrila, o composto central do trabalho a ser biotransformado para formação do ácido mandélico e mandelamida.

4.5 Triagens enzimáticas

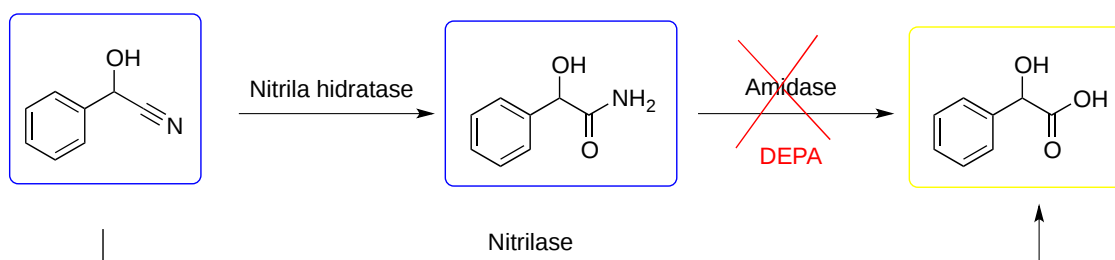
Os micro-organismos isolados foram submetidos a ensaios de triagem enzimática para detecção de NHases, Nases e amidases, em formato miniaturizado. Este ensaio é realizado em microplacas de 96 poços, com volume final de 200 µL, e é baseado em alterações da coloração do meio reacional (viragem do azul para o amarelo), indicando alteração do pH, por meio da utilização do indicador de pH Azul de Bromotimol. A vantagem deste ensaio está tanto na pequena quantidade de resíduos gerados devido ao reduzido consumo de reagentes, uma vez que é realizado em escala

miniaturizada, quanto ao fato de ser facilmente adaptável a sistemas robotizados. Além disso, o ponto de viragem da coloração pode ser detectado visualmente.

Uma vez que o pH ótimo para as enzimas realizarem a hidrólise/hidratação das nitrilas está entre 7,0 e 7,5, o pH do tampão utilizado foi fixado em 7,2 (pKa 7,2) e concentração 10 mM. Esta concentração foi selecionada devido à sua reduzida capacidade tamponante, tornando, assim, o ensaio mais sensível até mesmo para pequenas alterações de pH. Como o pKa do Azul de Bromotimol é 7,3 (localizado muito próximo ao pKa do tampão), ele foi o selecionado como o melhor indicador, pois, assim, as mudanças da cor do indicador seriam proporcionais às mudanças das concentrações de íons H^+ na solução.⁴

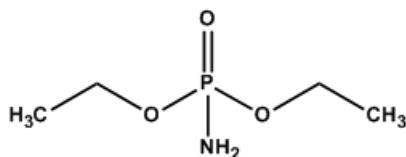
Este ensaio colorimétrico para triagem enzimática foi adaptado do ensaio descrito por Banerjee e colaboradores,^{4b} que dá ênfase somente à detecção de ácido carboxílico e amônia pela via das nitrilases; porém, não é mencionada a detecção da via das nitrila hidratases/amidases (Esquema 4). Em nosso ensaio, foi feita uma adaptação, em que um conhecido inibidor de amidase foi adicionado, o DEPA (dietilaminofosforamida) (Figuras 8 e 9), para que as duas vias (nitrilase e nitrila hidratase/amidase) fossem distinguidas, através da não formação de ácido carboxílico na via das nitrila hidratases.

Esquema 4 - Biotransformação da mandelonitrila catalisada pelas enzimas nitrilase, nitrila hidratase e amidase, com destaque para a inibição da formação de ácido pela dietilaminofosforamida (DEPA).



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

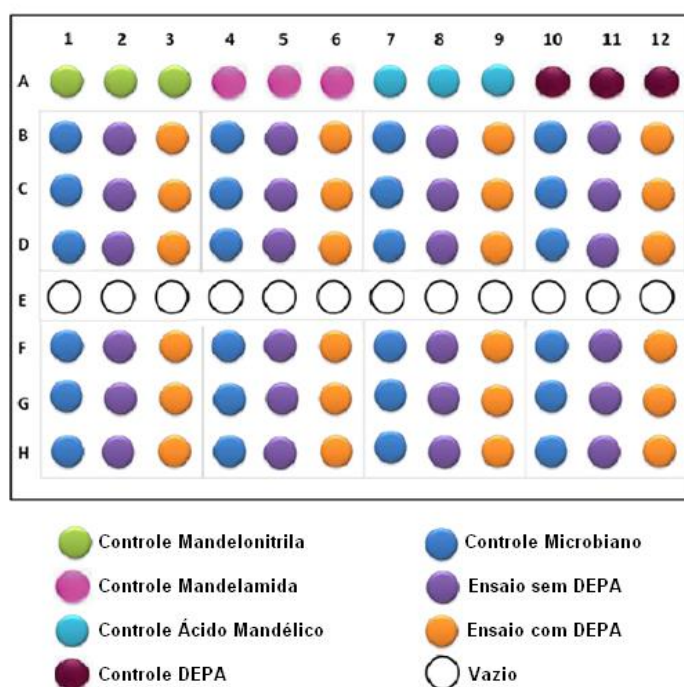
Figura 9 - Inibidor de amidases utilizado no ensaio para triagens enzimáticas, a dietilaminofosforamida (DEPA).



Fonte: Estrutura elaborada pela autora.

Para cada microplaca, foram testados 8 micro-organismos diferentes, sendo que tanto os controles (mandelonitrila, mandelamida, ácido mandélico, DEPA e microbiano) como os ensaios com DEPA e sem DEPA foram realizados em triplicata, como mostra o esquema da Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do ensaio para detecção das enzimas nitrilase, nitrila hidratase e amidase.



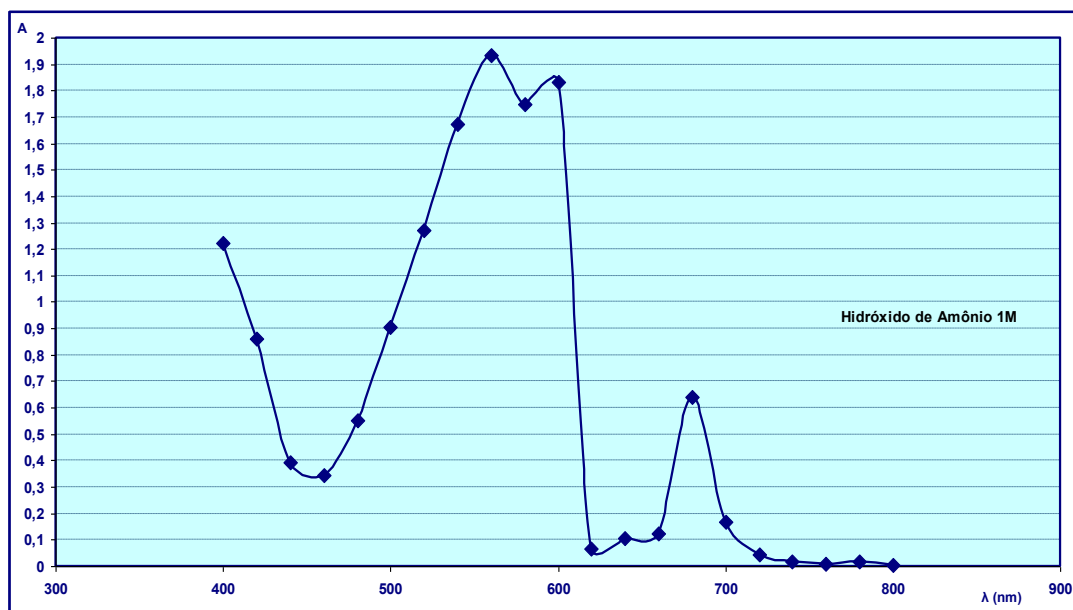
Fonte: Representação esquemática elaborada pela autora.

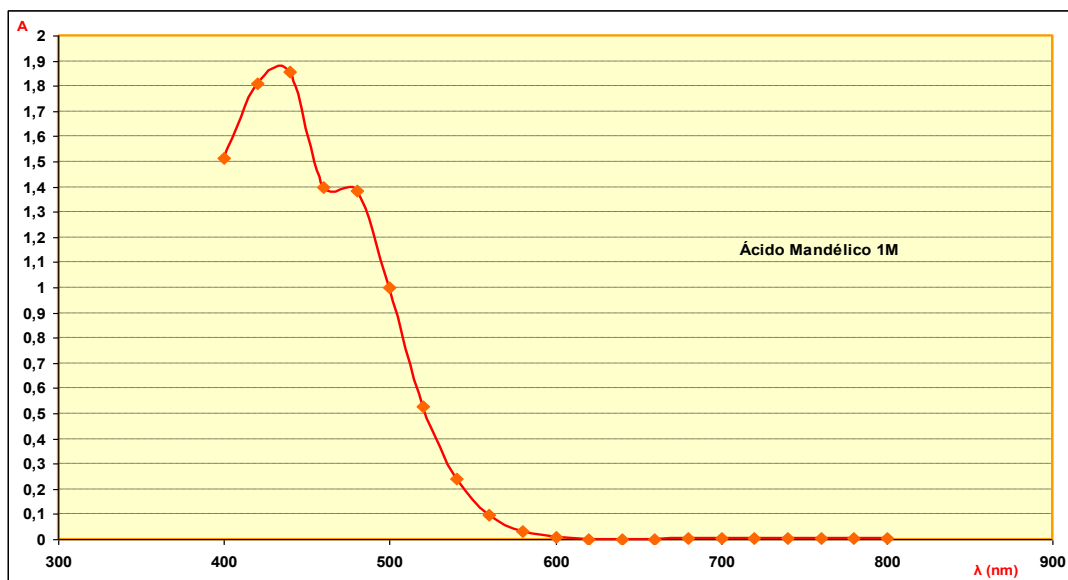
A leitura das microplacas pode ser realizada tanto por inspeção visual (através da observação da mudança de coloração do meio reacional), bem como por espectrofotometria, pela determinação do comprimento de onda ideal para a leitura dos resultados obtidos. As microplacas de 96 poços utilizadas nos experimentos são também

adaptáveis para leitoras de microplaca. Porém, como em nosso laboratório não possuímos este equipamento, foi realizada uma adaptação para leitura dos resultados, que consistiu de diferentes misturas de soluções de ácido mandélico e hidróxido de amônio analisadas em espectrofotômetro, uma vez que a amônia é produzida juntamente com o ácido na transformação das nitrilas e apresenta caráter básico. Quando em contato com o tampão acrescido do indicador azul de bromotimol, a amônia muda a coloração do tampão para azul escuro. Misturada à coloração amarela pela formação de ácido, a coloração final do tampão pode ser alterada para verde claro, por exemplo.

Com soluções de ácido mandélico 1M e de hidróxido de amônio 1M (preparadas com o mesmo tampão utilizado nos ensaios de triagem enzimática), foi realizada uma varredura em espectrofotômetro de luz U.V. entre os comprimentos de onda de 520nm até 800nm, para determinação do comprimento de onda onde há maior absorbância para o ácido e para a amônia. Para o ácido mandélico, o comprimento de onda selecionado foi o de 440nm, e para o hidróxido de amônio, 560nm. Foram geradas as curvas padrão para as duas soluções (Figura 11).

Figura 11 - Curvas padrão geradas para a solução de hidróxido de amônio 1M (em azul) e de ácido mandélico 1M (em laranja) a partir da varredura nos diferentes comprimentos de onda.



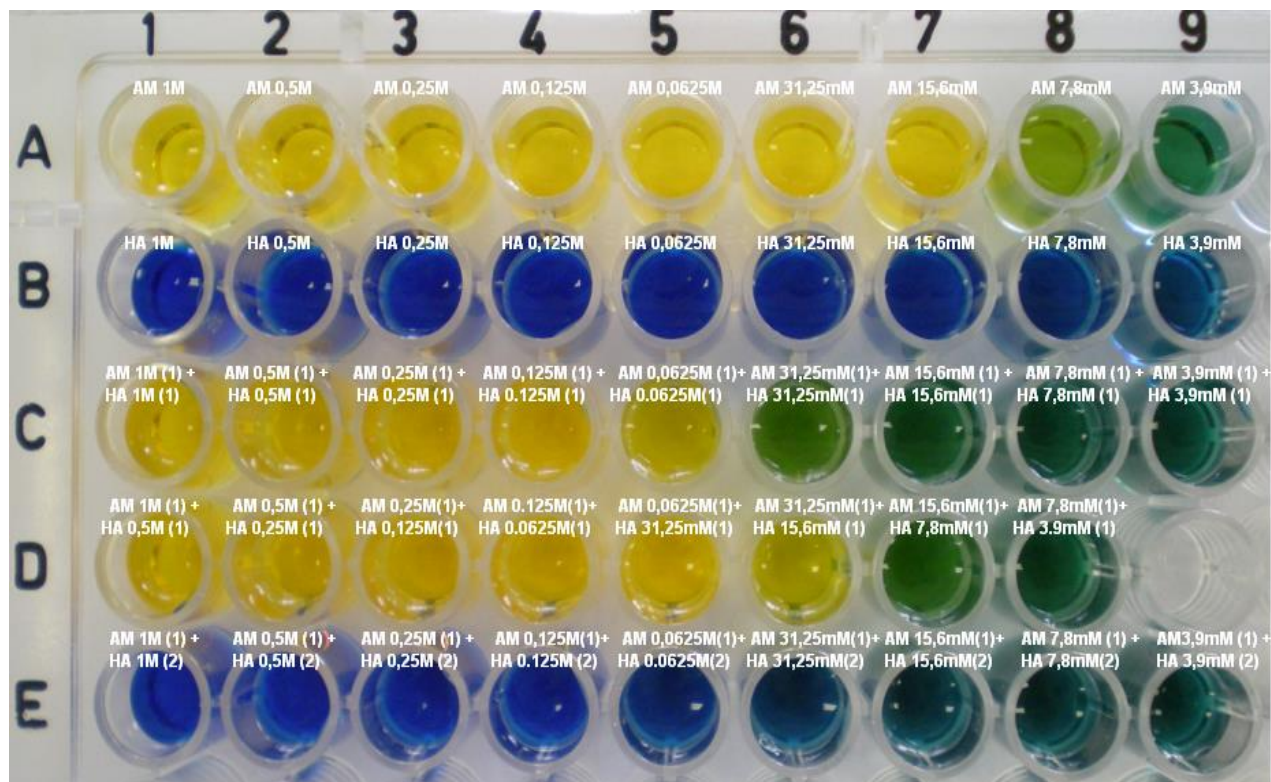


Fonte: Curvas padrão confeccionados pela autora.

A=absorvância; λ =comprimento de onda (em nm).

Com diferentes concentrações (1M, 0,5M, 0,25M, 0,125M, 0,0625M, 31,25mM, 15,6mM, 7,8mM e 3,9mM) de soluções de ácido mandélico e hidróxido de amônio e também diferentes proporções de cada uma dessas soluções, foram preparadas em uma microplaca de 96 poços as misturas (Figura 12) para comparação com os resultados obtidos dos ensaios de triagem enzimática.

Figura 12 - Microplaca contendo misturas de ácido mandélico e hidróxido de amônio em proporções variadas e também as diferentes concentrações de cada solução separadamente. As soluções foram preparadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,2, simulando o ensaio de triagem enzimática.



Fonte: Foto obtida pela autora.

AM=Ácido Mandélico; HA=Hidróxido de Amônio. Os números entre parênteses representam as proporções utilizadas de cada solução.

As diferentes misturas foram também analisadas por espectrofotometria nos dois comprimentos de onda selecionados para o ácido e para a amônia (440nm e 560nm), como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Misturas de ácido mandélico (AM) e hidróxido de amônio (HA) analisadas por espectrofotometria nos dois comprimentos de onda selecionados.

Misturas	440 nm	560 nm
AM 1M (1) + HA 1M (1)	1,909	0,080
AM 0,5M (1) + HA 0,5M (1)	1,856	0,071
AM 0,25M (1) + HA 0,25M (1)	1,876	0,074
AM 0,125M (1) + HA 0,125M (1)	1,886	0,073
AM 0,0625M (1) + HA 0,0625M (1)	1,882	0,140
AM 31,25mM (1) + HA 31,25mM (1)	1,775	0,715
AM 15,6mM (1) + HA 15,6mM (1)	1,623	1,140
AM 7,8mM (1) + HA 7,8mM (1)	1,526	1,306
AM 3,9mM (1) + HA 3,9mM (1)	1,492	1,414

AM 1M (1) + HA 0,5M (1)	1,878	0,055
AM 0,5M (1) + HA 0,25M (1)	1,882	0,049
AM 0,25M (1) + HA 0,125M (1)	1,888	0,046
AM 0,125M (1) + HA 0,0625M (1)	1,880	0,047
AM 0,0625M (1) + HA 31,25mM (1)	1,882	0,044
AM 31,25mM (1) + HA 15,6mM (1)	1,880	0,096
AM 15,6mM (1) + HA 7,8mM (1)	1,736	0,178
AM 7,8mM (1) + HA 3,9mM (1)	1,581	1,173
AM 1M (1) + HA 1M (2)	0,408	1,936
AM 0,5M (1) + HA 0,5M (2)	0,431	1,931
AM 0,25M (1) + HA 0,25M (2)	0,481	1,940
AM 0,125M (1) + HA 0,125M (2)	0,495	1,938
AM 0,0625M (1) + HA 0,0625M (2)	0,816	1,896
AM 31,25mM (1) + HA 31,25mM (2)	1,120	1,781
AM 15,6mM (1) + HA 15,6mM (2)	1,304	1,658
AM 7,8mM (1) + HA 7,8mM (2)	1,369	1,603
AM 3,9mM (1) + HA 3,9mM (2)	1,421	1,555

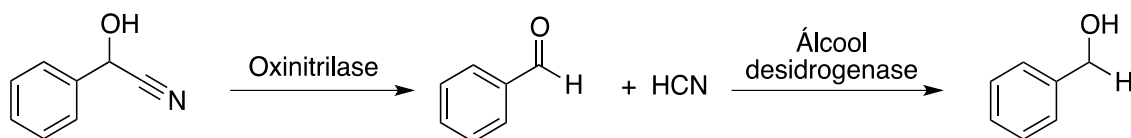
Fonte: Tabela elaborada pela autora.

A partir deste ensaio de triagem enzimática e da comparação com os padrões das misturas, foi possível diferenciar tanto a via da nitrilase como a da nitrila hidratase/amidase. Foram selecionados 9 micro-organismos promissores para prosseguirem os estudos, dentre eles: MLH-10, MLH-10R, MLH-12, MLH-13, MLH-18, MLH-07, MLH-08, MLH-09 e MLH-15.

Um ponto negativo observado no ensaio de triagem enzimática está no fato de alguns micro-organismos produzirem outros ácidos naturalmente que não aqueles de interesse, gerando, assim, falsos positivos. Porém, por meio de análises feitas por GC-MS (realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, IQ, UNICAMP), os resultados obtidos nas triagens foram confirmados.

Pela análise por GC-MS, detectou-se também a presença de álcool benzílico. A formação do álcool benzílico pode ser justificada pela presença das enzimas oxinitrilase e álcool desidrogenase, como mostrado no Esquema 5.

Esquema 5 - Formação de álcool benzílico a partir da mandelonitrila, catalisada pela oxinitrilase e álcool desidrogenase.



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

4.6 Reação de transformação da mandelonitrila

Após a seleção dos micro-organismos promissores pela formação de ácido no ensaio colorimétrico, foram realizadas reações de transformação da mandelonitrila, que consistiram de suspensão de células em tampão fosfato 100 mM pH 7,2 e mandelonitrila (proveniente de uma solução etanólica estoque 200 mM). As reações foram preparadas em microtubos de 1,5 mL e inseridas no Mixing Block sob agitação de 1000 rpm e a 30 °C, por 48 horas. Transcorrido o tempo determinado, centrifugou-se os microtubos e desprezou-se as células. Foram realizadas as extrações das fases aquosas com acetato de etila em pH 2 e pH 12. As reações em pH 2 foram derivatizadas, uma vez que o ácido mandélico ficou retido na coluna do cromatógrafo, não apresentando um pico definido no cromatograma. As fases orgânicas obtidas foram analisadas por GC-FID em coluna RTX-5. A partir dos cromatogramas gerados, foi feita a comparação dos resultados obtidos com os cromatogramas dos padrões comerciais para detecção dos compostos de interesse (Figura 13a).

A partir da visualização dos cromatogramas, verificou-se a formação do álcool benzílico (tempo de retenção 5,075 minutos) na extração em pH 12; além disso, na extração de pH 2, houve a formação de um outro composto, com tempo de retenção de 6,2 minutos, que foi encaminhado para análise por GC-MS, como foi feito para o álcool benzílico. No Quadro 1 está detalhada a presença ou ausência desses compostos nos 9 micro-organismos testados. De acordo com as análises dos cromatogramas, todos apresentaram os dois compostos.

Quadro 1 - Presença ou ausência dos compostos produzidos pela análise dos cromatogramas. Nota-se que todos os micro-organismos produziram os dois compostos.

Micro-organismo	Álcool Benzílico (Rf:5,075 min)	Composto desconhecido (Rf: 6,20 min)
MLH-07	+	+

MLH-08	+	+
MLH-09	+	+
MLH-10	+	+
MLH-10R	+	+
MLH-12	+	+
MLH-13	+	+
MLH-15	+	+
MLH-18	+	+

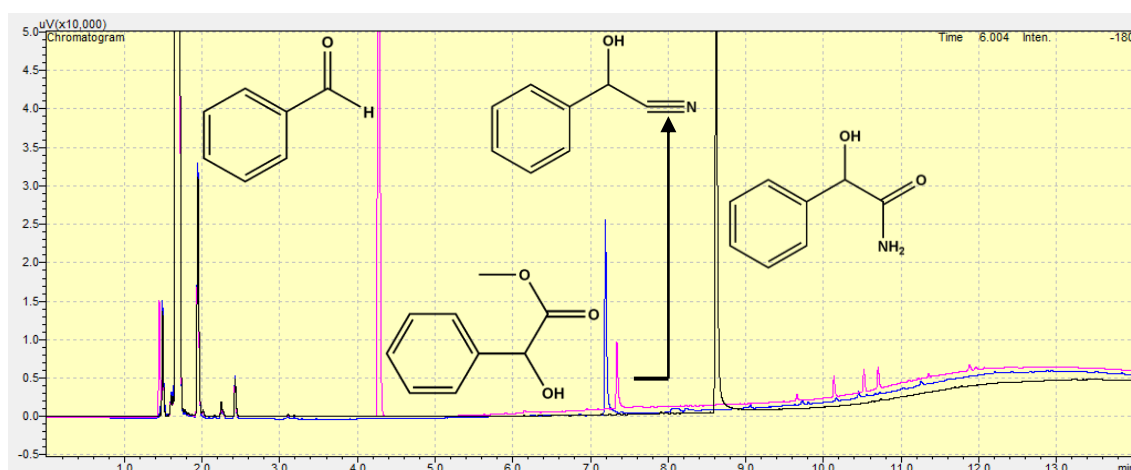
Fonte: Quadro elaborado pela autora.

+ = presença; - = ausência.

Comparando-se os cromatogramas dos padrões (Figura 13a) com os cromatogramas obtidos das extrações com acetato de etila (Figuras 13b e 13c), não foi detectada a formação dos compostos de interesse, nem mesmo a mandelonitrila, que foi o substrato utilizado para a reação. Provavelmente, a mandelonitrila foi incorporada pelas células microbianas e transformada em um composto que pode ter se inserido em alguma via metabólica do micro-organismo.

Figura 13 - Cromatogramas dos (a) padrões comerciais e de uma das extrações da reação de transformação da mandelonitrila (micro-organismo MLH-10), em (b) pH 2 e (c) pH 12.

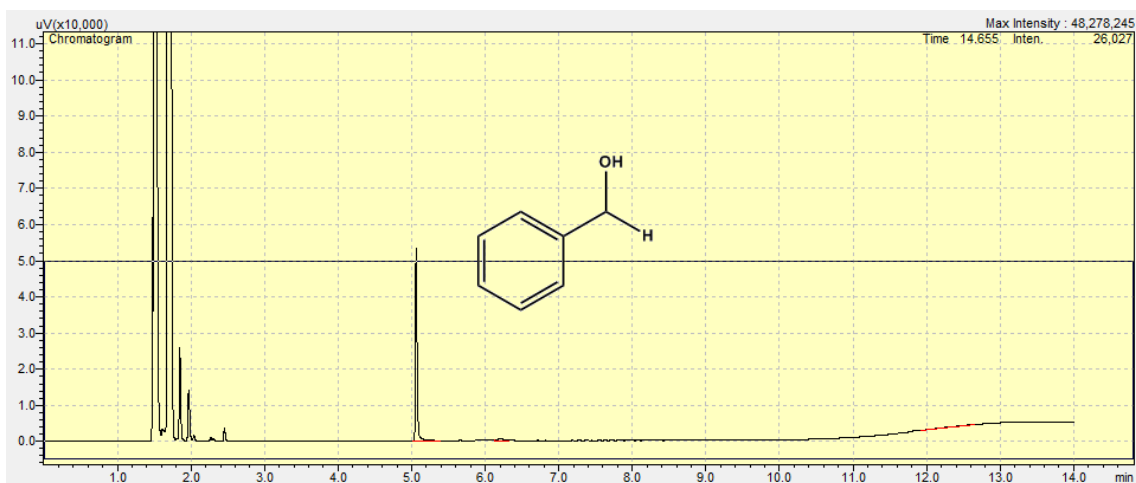
(a)



(b)



(c)



Fonte: Cromatogramas confeccionados pela autora.

4.7 Imobilização: determinação do coeficiente de partição dos compostos

Para determinação da afinidade (coeficiente de partição) dos compostos mandelonitrila, mandelamida e ácido mandélico pela matriz de alginato de sódio, foram preparados 250 mL de esferas de alginato. O experimento foi realizado em meio aquoso contendo as esferas de alginato sem células e uma quantidade conhecida (0,0001 mol) de cada um dos reagentes, todos adicionados em um erlenmeyer de 250 mL, que foi levado para o shaker a 170 rpm e 30 °C. Foram retiradas alíquotas da fase aquosa nos seguintes tempos: 1h, 4h, 8h, 20h, 24h e 48h. Cada alíquota foi extraída com acetato de

etila nos pHs 2 e 12, derivatizadas com $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (uma vez que havia ácido mandélico) e depois injetadas em GC, coluna RTX-5.

O ideal seria se a mandelonitrila tivesse maior afinidade pela esfera de alginato e a mandelamida e o ácido mandélico, pela fase aquosa, pois, dessa forma, durante as reações de transformação com micro-organismos imobilizados nas esferas, a mandelonitrila seria metabolizada pelo micro-organismo dentro das mesmas e os produtos, assim que formados, iriam para a fase aquosa. Assim, já haveria uma separação inicial dos produtos e facilitaria o processo de “*downstream*” (isolamento e purificação dos compostos).

Nas alíquotas de 1h e 4h, foi detectada a presença do éster (éster metílico do ácido mandélico, obtido pela reação de derivatização) nas fases aquosas. Porém, a partir das alíquotas de 8h, nenhum dos compostos foi detectado na fase aquosa, pois estavam no interior das esferas. Portanto, o alginato não se mostrou uma matriz ideal para os compostos, uma vez que todos tiveram praticamente o mesmo grau de afinidade pelas esferas, e nenhum deles pela fase aquosa (por pelo menos 48h, que seria o tempo da reação de transformação da mandelonitrila). São necessários novos estudos para avaliar outras matrizes que sejam adequadas para estes compostos.

4.8 Estudo cromatográfico dos compostos

Foram determinados os fatores de retenção (R_f) da mandelonitrila, mandelamida e ácido mandélico através da CCD (Cromatografia em Camada Delgada).

Os reveladores testados foram: Solução Reveladora de Ácido Fosfomolibdico, Verde de Bromocresol, Anisaldeído, Vapores de iodo e Câmara UV (comprimento de onda 264 nm). Os eluentes empregados foram o hexano e o acetato de etila. O Quadro 2 mostra algumas características dos compostos analisados.

Quadro 2 - Características da mandelonitrila e de seus derivados.

	Mandelonitrila	Mandelamida	Ácido mandélico
Fórmula Molecular	$\text{C}_8\text{H}_7\text{ON}$	$\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$
Massa Molar	133 g/mol	151 g/mol	152 g/mol
Densidade	1,117 g/mL	-	-

Observação	Líquido de coloração amarelada; apresenta benzaldeído	Sólido incolor	Sólido incolor com pequenos cristais
Solvente utilizado	Etanol	Acetato de etila	Etanol
Eluente utilizado	Hexano e Acetato de etila 3:1	Acetato de etila 100%	Acetato de etila e Hexano 3:1
Bons reveladores	Luz U.V. a 254 nm e Anisaldeído	Luz U.V. a 254 nm, Ácido Fosfomolibdico e Anisaldeído	Luz U.V. a 254 nm e Verde de Bromocresol
Valor de Rf	0,47	0,54	0,53

Fonte: Quadro elaborado pela autora.

5 CONCLUSÃO

Foi construída uma Coleção de Culturas Microbianas a partir de solos “virgens” (solo Campus UNESP) e solos expostos a compostos nitrilados (solo do entorno da lagoa de decantação de água de manipueira) cujos micro-organismos foram isolados como culturas puras. Estabeleceu-se um método adequado e eficaz para a preservação a curto e médio prazo destes micro-organismos garantindo o acesso ao patrimônio enzimático e genético dos mesmos. Alguns compostos foram avaliados em relação à sua capacidade de atuarem como indutores enzimáticos para nitrila hidratases. Dentre eles, acetonitrila e benzonitrila mostram-se os melhores resultados. Através da adaptação de um método enzimático para detecção de nitrilases descrito na literatura desenvolvemos um novo método que é capaz de distinguir entre os sistemas enzimáticos nitrilases e nitrila hidratases/amidases que fornecerá uma grande contribuição para os pesquisadores envolvidos com estes sistemas enzimáticos. Este método foi empregado com sucesso para diferentes classes de nitrilas e validado por cromatografia. Entretanto ele é passível de fornecer resultados falsos positivos para micro-organismos produtores de metabólitos ácidos excretados no meio extracelular e portanto, a realização dos controles microbianos são imprescindíveis. As análises por GC-MS das reações de biocatálise da mandelonitrila ainda indicaram a provável presença de álcool desidrogenases e oxinitrilases, este último é um sistema enzimático de interesse e que será investigado mais detalhadamente.

Em relação às imobilizações microbianas constatamos que o alginato de sódio não é uma matriz de imobilização indicada para a mandelonitrila. São necessários estudos para determinação de uma matriz adequada para este composto e seus derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. Green chemistry: an overview. *Green Chemistry*, v. 626, p. 1-17, 1996.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 33-44, 2002.

BANERJEE, A.; KAUL, P.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 8, p. 559-565, 2003.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A. Use of a UF-membrane reactor for controlling selectively the nitrile hydratase–amidase system in *Microbacterium imperiale* CBS 498-74 resting cells: case study: benzonitrile conversion. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 126–134, 2006.

DIAS, J.; REZENDE, R.; LINARDI, V. Bioconversion of nitriles by *Candida guilliermondii* CCT 7207 cells immobilized in barium alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 6, p. 757-761, 2001.

FOURNAND, D.; ARNAUD, A. Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 381–393, 2001.

GUO, X. L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. X. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

KOBAYASHI, M.; KOMEDA, H.; NAGASAWA, T.; NISHIYAMA, M.; HORINOUCHI, S.; BEPPU, T.; YAMADA, H.; SHIMIZU, S. Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *European Journal of Biochemistry*, v. 217, p. 327-336, 1993.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research & Development*, v. 10, p. 572-580, 2006.

LEUCHTENBERGER, W.; HUTHMACHER, K.; DRAUZ, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2005.

PATEL, R. N. Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances Food & Drug Administration: FDA's statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, v. 4, p. 338-340, 1992.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, v. 25, p. 66-73, 2006.

VELANKAR, H.; CLARKE, K. G.; PREEZ, R.; COWAN, D. A.; BURTON, S. G. Developments in nitrile and amide biotransformation processes. *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 11, p. 561-569, 2010.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

YURYEV, R.; LIESE, A. Biocatalysis: the outcast. *ChemCatChem*, v. 2, p. 103-107, 2010.