

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1003480-3 A2**



(22) Data de Depósito: 13/09/2010
(43) Data da Publicação: 15/01/2013
(RPI 2193)

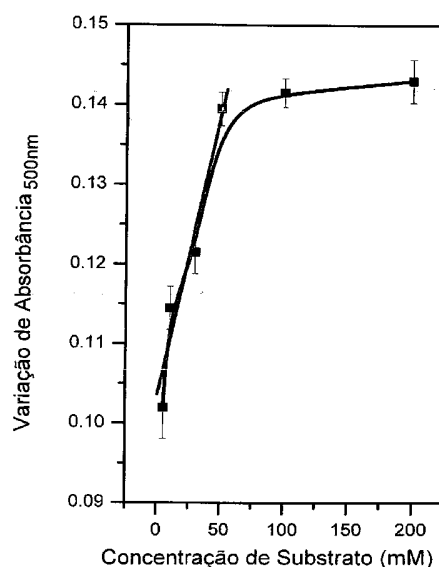
(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/14
G01N 33/22
C12Q 1/28
G01J 3/46

(54) **Título:** PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL

(73) **Titular(es):** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

(72) **Inventor(es):** EDWIL APARECIDA DE LUCCA GATTÁS, Maristela Freitas Sanches Peres

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL em que a metodologia de dosagem parte da purificação das enzimas envolvidas no ensaio, a partir de levedura de panificação, uma fonte barata e de fácil obtenção para ser usada no laboratório de controle de qualidade de bebidas e indústrias de biocombustível. O objeto da presente patente de invenção consiste em obter preparação enzimática parcialmente purificada da levedura comercial seca de panificação, contendo a glicerol - fosfato oxidase e glicerol quinase, e preparação enzimática bruta de extrato de rabanete (fonte de peroxidase) para montagem de ensaios de dosagens de glicerol, em amostras químicas e biológicas. A presente invenção está relacionada com o processo para obtenção e determinação de substâncias envolvendo a oxidase, quinase e peroxidase.



“PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL”

Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de um inédito processo para determinação de glicerol, particularmente em biocombustíveis e vinhos, adaptado para rotina industrial, e novos ensaios, de concepção inovadora e dotado de importantes melhoramentos tecnológicos e funcionais, segundo os mais modernos conceitos de engenharia química e de acordo com as normas e especificações exigidas, revestindo-se de características próprias e dotadas com requisitos fundamentais de novidade e atividade inventiva, fazendo resultar uma série de reais e extraordinárias vantagens técnicas, práticas e econômicas.

Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, o glicerol é o principal produto secundário da fermentação alcoólica e sua concentração aumenta em condições de estresse celular. A dosagem de glicerol em destilarias é uma prática diária e necessária no acompanhamento do processo fermentativo. As determinações dos subprodutos de uma fermentação permite determinar e quantificar os desvios metabólicos que afetam o rendimento do processo. Um dos desafios atuais é aumentar a oferta de álcool combustível e inovações na linha de produção das usinas somam o controle do processo. O aumento da produção no setor sucro-alcooleiro brasileiro não atenderá a demanda programada para os próximos anos, no atendimento do mercado interno e de exportação.

O glicerol é também frequentemente adicionado a vários tipos de alimentos (Wieland, O., 1962) como umectante, cuja finalidade é aumentar a retenção de água. Segundo Antunes, 1993, um composto umectante captura a umidade do ar de alimentos armazenados em ambiente seco. A produção de bebidas,

incluindo vinhos e cerveja, mostra teores variáveis de glicerol que valem ser quantificados. A quantificação do glicerol, utilizando técnicas simples, precisas e com alta especificidade, vem assumindo grande interesse na área médica relacionados à quantificação de lipídios (Spinella e Mager, 1966). Assim, o ensaio de quantificação do glicerol tem importância na área médica, na área industrial como produção de bebidas, de biocombustíveis e na conservação de alimentos. Este trabalho identificou e caracterizou parcialmente a glicerol-3-fosfato oxidase e a glicerol quinase em fermento de panificação. A quantificação da atividade destas enzimas foi realizada diretamente através da metodologia que utiliza a peroxidase de rabanete e um sistema cromogênico para identificação da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado. Portanto, o ensaio enzimático colorimétrico para quantificar o glicerol está baseado na fosforilação do glicerol pela glicerol quinase, seguida por oxidação do glicerol fosfato com glicerol fosfato oxidase, que gera H_2O_2 . A água oxigenada formada é reduzida por peroxidase de rabanete. O sistema cromogênico é constituído por 4-aminoantipirina e fenol e como resultado um produto colorido, que absorve a 500 nm. A leitura espectrofotométrica é proporcional a quantidade de glicerol da amostra.

ESTADO DA TÉCNICA

O documento de patente nacional PI0205552-0 descreve um *processo de obtenção de preparação rica em desidrogenase*, em que um processo para determinação de substâncias envolvendo a desidrogenase, método de ensaio para dosar substâncias compreendendo a preparação rica em desidrogenase, composição para ensaio de substâncias compreendendo a preparação rica em desidrogenase, preparação

enzimática compreendendo desidrogenases, utilização da preparação enzimática compreendendo desidrogenases para ensaio de substâncias e "kit" para ensaio de substâncias compreendendo a citada preparação.

5

O documento de patente nacional PI0504024-8, denominado "*Quantificação espectrofotométrica de glicerol em biodiesel*", ensina de um modo geral, que é relacionada a uma análise para quantificação de glicerol (total e livre) em amostra de biodiesel por espectrofotometria de luz visível.

10

O documento de patente nacional PI 0316897-2 ensina um *método de seleção para desidratases dependentes de B12, seqüências de ácido nucléico, desidratase mutante dependente de B12, método para a criação de mutantes de desidratase dependente de B12 e métodos para a identificação de desidratase dependente de B12* em que a presente invenção refere-se a seqüências de desidratases dependentes de B12 com reações cinéticas aprimoradas, reduzindo, assim, a inativação do suicídio de enzimas na presença de glicerol e 1,3-propanodiol. Essas enzimas foram criadas utilizando-se PCR propenso ao erro e mutagenese dirigida a oligonucleotideo para atingir o gene dhab1, codificador da subunidade do glicerol desidratase. Mutantes com reações cinéticas aprimoradas são rapidamente identificados utilizando-se testes de alta produtividade, também descritos no presente.

15

20

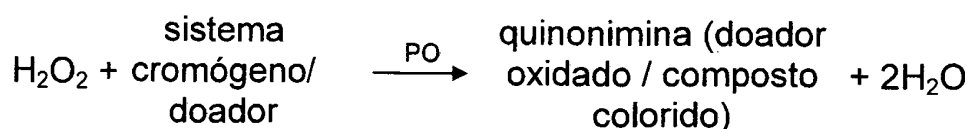
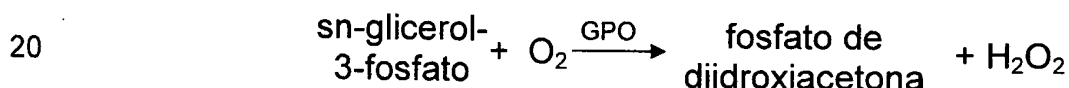
O documento de patente nacional PI 0406770-3 descreve um *método para a produção in situ de um emulsificante em alguns gêneros alimentícios*, em que uma enzima lipídio acil transferase é acrescentada aos gêneros alimentícios. Preferivelmente o emulsificante é produzido sem um aumento ou sem um aumento substancial no conteúdo de ácido graxo livre dos gêneros alimentícios.

25

Preferivelmente, a enzima lipídio acil transferase e aquela que e capaz de transferir um grupo acil de um lipídio para um ou mais dos seguintes receptores acil: um esterol, um estanol, um carboidrato, uma proteína ou uma sub-unidade da mesma, um glicerol.

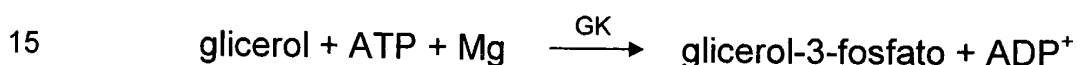
- 5 Preferivelmente, além de um emulsificante, um ou mais dos ester de estanol ou ester de estanol ou ester de proteína ou um ester de carboidrato ou um diglicerídio ou um monoglicerídio podem ser produzidos. Um ou mais de esses podendo funcionar como um emulsificante adicional.

- 10 A enzima glicerol 3-fosfato oxidase (EC 1.1.3.21; sn-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidoreductase; GPO) é uma flavoproteína (cofator: flavina adenina dinucleotídio - FAD) pertencente ao grupo das oxidoreductases (Camargo et al., 2008). A glicerol-3-fosfato oxidase catalisa especificamente a oxidação do
- 15 glicerol-3-fosfato a fosfato de diidroxiacetona concomitantemente a redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio, conforme a seguinte reação, que por sua vez, reage com sistema de cor (ŠŮCHOVÁ et al., 1992; KIRANAS et al., 1998; MACHOVÁ et al., 2000):



- 25 Trata-se de uma enzima encontrada em diversas fontes de microorganismos, podendo ser principalmente isolada a partir de bactérias lácticas (Tabela 2), não havendo, contudo, registro de sua ocorrência na espécie humana (ESDERS e MICHIRINA, 1979; KIRANAS et al., 1998; MACHOVÁ et al., 2000).

Glicerol quinase de diferentes origens têm sido utilizadas para ensaio de glicerol (Hellmer et al., 1989; Hayashi and Lin, 1967; Janson and Cleland, 1974; Winer et al., 1985; Aragon et al., 2008). Trata-se de uma enzima regulatória do metabolismo de glicerol em *E. coli*. Além disto, fornece esqueleto carbonado para a gliconeogênese (síntese de glicose) e para a síntese de lipídios (Nilsson, et al., 1989) e transporta equivalente redutor (FADH₂ e NADH) do citosol para a mitocôndria. A glicerol quinase é codificada pelo *Sacharomyces cerevisiae* a partir da seqüência contida no gene GUT1 (gene da glicerol quinase) segundo Pavlik et al., 1993. A glicerol quinase de *Candida mycoderma* fosfolira o glicerol quando utiliza-se Mg.ATP, Mg.ITS, Mg.GTP e Mg.UTP, inibida de forma não competitiva por Mg.ADP e catalisa a reação:



Isso posto, os objetivos da presente patente são:

- a obtenção de uma preparação enzimática (ou preparações enzimáticas) rica em glicerol fosfato oxidase (sn-glicerol-3-fosfato: oxigênio 2-oxidoreductase, EC 1.1.3.21), glicerol-quinase (ATP:glicerol 3-fosfotransferase, EC 2.7.1.30), a partir de extrato obtido da levedura seca de panificação;
- a estabilização da preparação enzimática, com a presença de íons manganês durante a diálise;
- a estocagem da preparação enzimática em geladeira na forma de pó liofilizado ou em solução contendo estabilizantes osmótico, salinos e/ou inibidores de proteases;
- a utilização da preparação enzimática, para o

ensaio do glicerol, baseado na medida da variação da concentração do H_2O_2 , na região do espectro visível pela conversão do H_2O_2 em produto colorido por reação com 4-aminoantipirina e fenol;

- a associação do magnésio na reação de
- 5 ensaio do glicerol utilizando-se metodologias; e
- o uso de "kit" para os ensaios de glicerol, utilizando-se a preparação enzimática (ou preparações enzimáticas) e os métodos de ensaio para amostras de biocombustíveis e vinhos.

A Figura 1 é um gráfico da curva padrão para
10 determinação do teor de glicerol, representando a variação de absorbância em função da concentração de substrato.

Processo de obtenção de preparação rica em glicerol quinase e glicerol fosfato oxidase:

10 g de levedura seca foram suspensa em 100
15 ml de tampão Tris/HCl contendo B-mercaptoetanol. Adicionam-se pérolas de vidro e procede-se o rompimento celular. Precipitações protéicas, realizadas com polietileno glicol 3350 são seqüenciadas no sobrenadante da centrifugação do extrato celular obtido do rompimento celular. As nucleoproteínas foram precipitadas pela
20 adição de sulfato de estreptomicina 1% (p/v). Após centrifugação o precipitado é recolhido e em seguida suspenso em tampão. A suspensão resultante foi dialisada e a preparação enzimática foi novamente precipitada com suspensão contendo 30% (p/v) de PEG 3350, dialisada e submetida à liofilização.

Determinação do teor de proteína total

25 O ensaio da proteína total foi realizado segundo o método Folin-Lorwy modificado por Layne (1975) com soro albumina bovina como padrão. Os reagentes do tubo de ensaio foram: 1 ml de amostra diluída, 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu e 5 ml

da mistura de soluções – 10 ml de carbonato de sódio 2%, 10 ml de hidróxido de sódio 0,1N, 1 ml de sulfato de cobre 0,5% e 1 ml de tartarato de sódio 1%. Paralelamente, o tubo controle continha os mesmos reagentes e 1 ml de água no lugar da amostra. As diferenças
5 entre as absorbâncias (600 nm) medidas no tubo ensaio e o tubo controle foram obtidas, utilizadas na determinação da concentração de proteína total.

Determinação do teor de glicerol

Os reagentes do tubo ensaio foram: 0,9 ml de
10 glicerol 0,45M, Tampão glicina/NaOH 0,01M pH 9,8 contendo 0,88M de hidrato de hidrazina, 0,210 ml de solução de sulfato de magnésio 0,2M, 0,150 ml 4-aminoantipirina 0,1% (p/v); 0,300 ml de fenol 0,1% (p/v); um volume de preparação enzimática contendo 0,1 U de glicerol fosfato oxidase e 0,50 U de glicerol quinase, 1 U de peroxidase de
15 rabanete e água para um volume final de 3,3 ml, a 60 °C. A reação foi iniciada pela adição da preparação enzimática. Paralelamente, o tubo controle continha os mesmos reagentes e 0,9 ml de água no lugar do glicerol. As diferenças entre as absorbâncias (500 nm) medidas no tubo ensaio e o tubo controle foram obtidas e utilizadas na
20 determinação da concentração do glicerol. Cada ponto representado na curva padrão é resultado da média de 03 determinações (Figura 1).

O processo de determinação de glicerol apresentou sensibilidade na faixa de 5 a 50 mM (Figura 1). Amostras de vinho e de mosto fermentado de caldo-de-cana foram submetidos
25 à evaporação (antes do ensaio) em forno de microondas para eliminação do etanol. Volumes de 5,0 ml das amostras foram submetidos a evaporação até secagem: 2 minutos (potência média) para amostras de vinhos (tinto e branco) e 6 minutos para amostras de caldo de cana fermentado. A seguir realizaram-se as diluições

necessárias para dosagens.

A tabela 1 abaixo apresenta os valores de glicerol encontrado no caldo fermentado da destilaria e no vinho e ensaio de recuperação do glicerol adicionado nas mesmas amostras.

Amostragens	Concentração de glicerol (g/l)			
	Dosagem	Ensaio de Recuperação		
		adicionado	encontrado	Recuperado (%)
Vinho tinto	5,7	3,7	9,1	96,8
Vinho Branco	6,17	3,7	9,8	99,3
Caldo fermentado	5,30	3,7	9,1	101,1

A dosagem do glicerol foi possível com a preparação enzimática quando aplicada ao método enzimático descrito acima. A recuperação do glicerol adicionado ao vinho tinto, vinho branco e caldo-de-cana fermentado mostrou um desvio máximo de apenas 3,8%. Adições de quantidades menores de glicerol não puderam ser detectadas por causa das diluições elevadas. Assim, a preparação enzimática, parcialmente purificada, pode ser utilizada sem riscos para estes tipos de amostras.

A tabela 2 a seguir representa obtenção da preparação rica em glicerol fosfato oxidase (GPO) obtida a partir de 20 gramas de levedura seca.

Etapa	Volume (mL)	Atividade (U)	Proteína (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Ativ. Relativa
Extrato bruto	34,0	0,476	923,44	0,0005	1,0
Sulfato de Estreptomicina	30,0	0,480	831,00	0,0006	1,2
Precipitado Sol. 30% (p/v) PEG 3350 e dialisado	2,2	0,425	40,24	0,0106	21,2

A tabela 3 abaixo ilustra a comparação de custo das enzimas comerciais e obtidas no nosso laboratório. O custo das enzimas peroxidase (PO), glicerol 3- fosfato oxidase (GPO) e glicerol quinase (GK) foram calculados por análise.

Enzimas	Enzimas Comercial (Sigma, USA)		Nosso Extrato
	Frasco com 5KU	R\$1,30	R\$0,02
PO (1U)	Frasco com 500U	R\$1,45	R\$0,20
GPO (0,1U)	Frasco com 200U	R\$0,95	R\$1,0
GK (0,5U)		R\$3,70	R\$1,22
TOTAL			

Não se tem conhecimento de nenhum processo para determinação de glicerol adaptado para rotina industrial e novos ensaios que reúna conjuntamente, todas as características construtivas e funcionais acima relatadas, e que diretamente ou indiretamente, é ou foi tão efetivo quanto o processo objeto da presente patente.

Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definidos nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1 – “PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL”

caracterizado pelo fato de utilizar preparações enzimáticas e ser baseado na medida da variação da concentração do H_2O_2 , na região do espectro visível pela conversão do H_2O_2 em produto colorido por reação com 4-aminoantipirina e fenol.

2 – “PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL”,

conforme reivindicado em 1, caracterizado pelas reações para determinação do glicerol ocorrerem com a associação de magnésio.

10 3 – “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS RICAS EM GLICEROL FOSFATO OXIDASE (SN-GLICEROL-3-FOSFATO: OXIGÊNIO 2-OXIDORREDUTASE, EC 1.1.3.21), GLICEROL-QUINASE (ATP:GLICEROL 3-FOSFOTRANSFERASE, EC 2.7.1.30) E RESPECTIVAS
15 PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS”, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de partir de extrato obtido da levedura seca de panificação.

20 4 – “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS RICAS EM GLICEROL FOSFATO OXIDASE (SN-GLICEROL-3-FOSFATO: OXIGÊNIO 2-OXIDORREDUTASE, EC 1.1.3.21), GLICEROL-QUINASE (ATP:GLICEROL 3-FOSFOTRANSFERASE, EC 2.7.1.30) E RESPECTIVAS
25 PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS”, de acordo com as reivindicações 1 e 3, caracterizado pela estabilização das ditas preparações enzimáticas ser realizada com a presença de íons manganês durante a diálise.

5 – “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS RICAS EM GLICEROL FOSFATO OXIDASE (SN-GLICEROL-3-FOSFATO: OXIGÊNIO 2-OXIDORREDUTASE, EC

1.1.3.21), GLICEROL-QUINASE (ATP:GLICEROL 3-FOSFOTRANSFERASE, EC 2.7.1.30) E RESPECTIVAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS”, obtidas conforme reivindicado em 1, 3 e 4, caracterizado pela estocagem das ditas preparações 5 enzimáticas ser em geladeira na forma de pó liofilizado ou em solução contendo estabilizantes osmótico, salinos e/ou inibidores de proteases.

6 – “KIT PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL”, conforme reivindicado em 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pelo fato de ser 10 utilizado para quantificação de glicerol tanto em biocombustíveis como em vinhos.

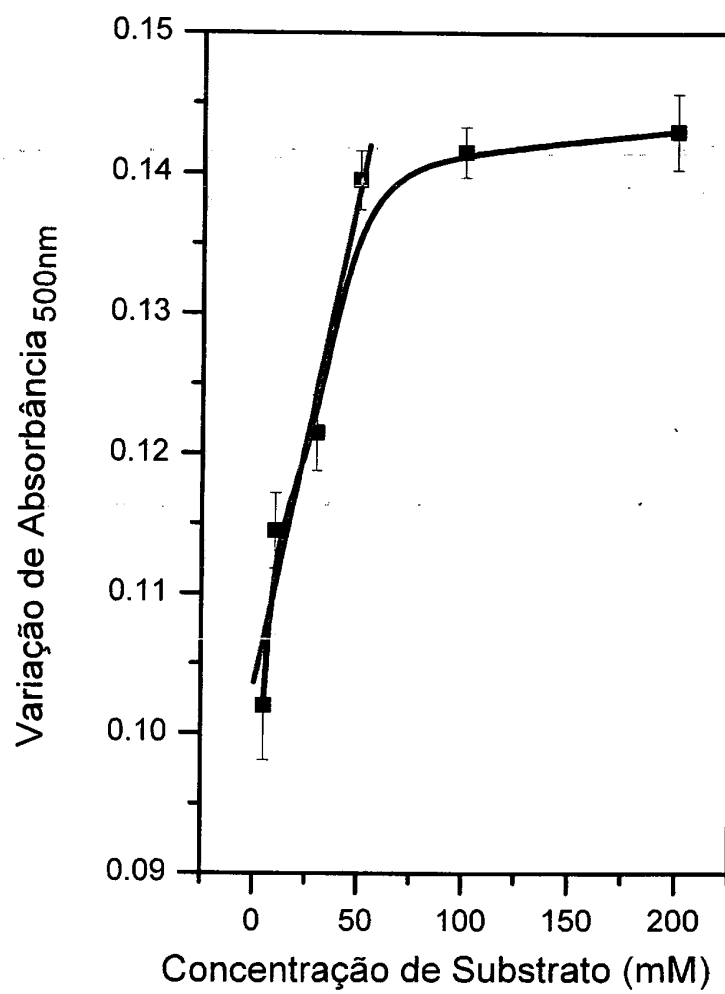


Figura 1

RESUMO

Patente de invenção: “PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICEROL” em que a metodologia de dosagem parte da purificação das enzimas envolvidas no ensaio, a partir de levedura de panificação, uma fonte barata e de fácil obtenção para ser usada no laboratório de controle de qualidade de bebidas e indústrias de biocombustível. O objeto da presente patente de invenção consiste em obter preparação enzimática parcialmente purificada da levedura comercial seca de panificação, contendo a glicerol – fosfato oxidase e glicerol quinase, e preparação enzimática bruta de extrato de rabanete (fonte de peroxidase) para montagem de ensaios de dosagens do glicerol, em amostras químicas e biológicas. A presente invenção está relacionada com o processo para obtenção e determinação de substâncias envolvendo a oxidase, quinase e peroxidase.