



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – CPGQB
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
ENZIMOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OXIDOREDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA
DE BACTÉRIAS TERMOTOLERANTES DO GÊNERO *ACETOBACTER***

Adriana Reis Todaro

Maceió - Alagoas
Dezembro de 2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – CPGQB
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
ENZIMOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OXIDOREDUÇÃO ENANTIOSELETIVA
DE BACTÉRIAS TERMOTOLERANTES DO GÊNERO *ACETOBACTER***

Adriana Reis Todaro

Dissertação de mestrado desenvolvida no Curso de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do Título de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Salgueiro Machado

Maceió - Alagoas
Dezembro de 2005

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- T633a Todaro, Adriana Reis.
 Avaliação do potencial de oxidação-redução enantiosseletiva de bactérias termotolerantes do gênero *Acetobacter* / Adriana Reis Todaro. – Maceió, 2005. **xiv, 87 f. : il. tabs., grafs.**
- Orientadora: Sonia Salgueiro Machado.
 Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de **Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Maceió 2005.**
- Bibliografia: f. [72]-83.**
 Apêndices: f. [84]-87.
1. Processos químicos. 2. *Acetobacter*. 3. Álcool desidrogenase. 4. Reação de oxidação-redução. I. Título.

CDU: 547



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Adriana Reis Todaro**, intitulada: “**Avaliação do Potencial de oxidoredução enantiosseletiva de Bactérias Termotolerantes do Gênero *Acetobacter***”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 21 de dezembro de 2005, às 09:00 horas na sala de aula do PPGQB.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.ª. Dr.ª Sônia Salgueiro Machado
Orientadora – IQB/UFAL

Prof.ª. Dr.ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Depto. de Bioquímica - CCB/UFPE

Prof.ª. Dr.ª. Ana Maria Queijeiro Lopez
IQB/UFAL

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
IQB/UFAL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Misael e Francisca, ao meu filho Giancarlo, em especial à Prof^a. Sonia, que com seu apoio e dedicação incessante divide comigo mais uma conquista. À Marcelo, meu marido, por sua dedicação, compreensão e resignação. À minha sogra, Ábia, que prestou apoio e reconhecimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

O temor ao Senhor é o princípio, que põe no coração dos puros conhecimento e inteligência. Obrigada meu Deus.

A Professora SONIA S. MACHADO,

Incansável e respeitada pesquisadora, referência na área de Enzimologia, por sua cordialidade e bom senso, aliados a sua capacidade técnica foram imprescindíveis para este trabalho. Pela atenção e presença marcantes no transcorrer do projeto de pesquisa, pelo estímulo, pela colaboração e orientação. À minha imensa gratidão pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho e pelo estímulo e oportunidades cedidas tão importantes para minha formação.

Ao pessoal do laboratório

Glaucevane da Silva Guedes, Priscilla da Fonseca Silva e Ana Patrícia de S. Silva pela amizade, estímulo, colaboração e dedicação ao trabalho de pesquisa. Aos colegas Ana Lucila, Janine Maciel, Janira Couto, Gilberto Ribeiro, Andréa Barros, Fabiano dos Santos, Larissa Faria e Jefferson Silva pela amizade e pelo companheirismo demonstrado. A Prof^a. Dr^a. Márcia Pleth, ao Prof^o Dr. Barry Charlwood e Dr^a. Brancilene de Araujo, por sua constante solicitude.

As indústrias de vinagre

Mari Indústria Comércio de Alimentos Ltda. (Sabor), Indústria e Comércio Conde Ltda. (Coroa) e Indústria e Comércio de Condimento Ltda. (Imperial), por fornecer o material biológico (amostra do recheio dos reatores e vinagre não pasteurizado) para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana e Johnnatan Duarte de Freita, que gentilmente forneceram amostras dos álcoois ((*rac*)2-Metil-4-heptanol, (*rac*)6-Metil-hept-2-en-4-ol (Rinconforol), (*rac*)2-Metil-4-octanol e (*rac*)4-Metil-5-nonanol), sintetizados no Laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais (DQ/UFAL).
- À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Queijeiro López do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Digital e Microbiologia Ambiental (DQ/UFAL) que permitiu a utilização centrífuga refrigerada Sigma 2K15 (Osterode, Alemanha), para a realização dos últimos experimentos desse estudo, quando enfrentei dificuldades com a manutenção daquela com a que vinha trabalhando.
- Ao Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos do Laboratório de Derivados da cana de Açúcar – Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT/UFAL) que permitiu o uso do microscópio binocular NICON Mod. ECLIPSE E-200 acoplado a câmera de vídeo.
- Ao Prof. Nivaldo Soares Alves, pela valiosa contribuição e sugestões que foram essenciais para realização deste trabalho.
- Aos Professores Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana e Dr^a. Ana Maria Queijeiro López e à Dr^a. Brancilene de Araujo que se fizeram presentes na minha banca de qualificação e pela contribuição da melhoria da qualidade deste trabalho.
- Aos Professores Dr^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana e Dr^a. Ana Maria Queijeiro López que se fizeram presentes na minha banca de defesa e pela contribuição da melhoria da qualidade deste trabalho.
- Ao Corpo Docente da Pós-Graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, pelos ensinamentos e pela agradável convivência.
- Aos colegas Natália Velásquez, André Lima, Vladimilisa Silva, Lysete Bastos, Mirela Cavalcanti, Mércia Silva, Maria Emília de Menezes, Daniel de Melo, Carolina Tavares, enfim, a todos, que de uma forma direta ou indireta colaboraram com este projeto, os nossos mais sinceros agradecimentos.
- Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições: Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas – FAPEAL, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. A todos o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

BIBLIOTECA CENTRAL.....	III
DIVISÃO DE TRATAMENTO TÉCNICO.....	III
<i>Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale.....</i>	<i>III</i>
XIV, 87 F. : IL. TABS., GRAFS.....	III
ALAGOAS. CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA. MACEIÓ 2005.	III
.....	III
BIBLIOGRAFIA: F. [72]-83.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE APÊNDICES	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO.....	2
1.1. <i>Fontes de obtenção das bactérias do ácido acético.....</i>	<i>2</i>
1.2. <i>Caracterização e diferenciação entre os gêneros das bactérias do ácido acético.....</i>	<i>2</i>
1.3. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO.....	4
1.4. <i>Aplicações biotecnológicas das bactérias do ácido acético.....</i>	<i>5</i>
1.5. <i>Enzimas chaves de bactérias do ácido acético envolvidas em biotransformação.....</i>	<i>7</i>
1.6. <i>Aplicação de enzimas em biossensores.....</i>	<i>11</i>
2. AS DESIDROGENASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO.....	12
2.1. <i>Desidrogenases NAD-dependente e NAD-independente</i>	<i>12</i>
2.2. <i>Aspectos gerais das álcool desidrogenases primárias.....</i>	<i>14</i>
2.3. <i>Homologia.....</i>	<i>16</i>
3. MECANISMOS DE CATÁLISE DA METANOL DESIDROGENASE.....	22
4. ACEPTORES DE ELÉTRONS.....	25
4.1. <i>Aceptores naturais de elétrons</i>	<i>25</i>
4.2. <i>Aceptores artificiais de elétrons</i>	<i>26</i>
5. MODELOS CINÉTICOS.....	26
6. ESPECIFICIDADE PARA SUBSTRATOS.....	27
7. ENANTIOSELETIVIDADE DAS ÁLCOOL DESIDROGENASES DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO.....	28
8. ÁLCOOL DESIDROGENASE NAD-INDEPENDENTE EM BIOCATÁLISE.....	30
9. IMPORTÂNCIA DOS ÁLCOOIS QUIRAIS.....	32
9.1. <i>MERCADO MUNDIAL DE DROGAS QUIRAIS.....</i>	<i>33</i>
10. RESOLUÇÃO CINÉTICA.....	35
11. REDUÇÃO ASSIMÉTRICA.....	37
12. JUSTIFICATIVA	38
13. OBJETIVOS.....	39
13.1. <i>Objetivo geral.....</i>	<i>39</i>
13.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>39</i>
CAPÍTULO 2.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40

2.1. Assepsia das vidrarias e dos meios de cultivo.....	41
2.2. Material Microbiológico	41
2.3. Quantificação da atividade da Álcool desidrogenase NAD-independente (QH-ADH) na biomassa produzida.....	44
2.4. Quantificação das proteínas totais presentes nos extratos livre de células	45
2.5. Determinação da cinética aparente dos extratos brutos de células de isolados do gênero <i>Acetobacter</i> ao substrato etanol	46
CAPÍTULO 3.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1. Cultivo e isolamento dos isolados de bactérias do ácido acético.....	48
3.2. Aspecto morfológico da colônia dos isolados de LBVE1 e LBVE4.....	50
3.3. Produção de biomassa por inoculação direta.....	51
3.4. Influência do inóculo líquido na produção de biomassa	53
3.5. Influência da temperatura na produção de biomassa	55
3.6. Quantificação da atividade da álcool desidrogenase NAD-independente em extratos brutos de LBVE1 e LBVE4.....	57
3.7. Quantificação de proteínas totais presentes nos extratos brutos dos isolados LBVE1 e LBVE4	58
3.8. Avaliação do perfil de especificidade da álcool desidrogenase NAD-independente nos extratos brutos de LBVE1 e LBVE4	60
3.9. Parâmetros cinéticos aparentes da álcool desidrogenase NAD-independente nos extratos brutos de LBVE1 e LBVE4	65
CAPÍTULO 4.....	69
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICES.....	84

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1 - Sistemas enzimáticos de oxidação de álcoois e açúcares em espécies do Gênero *Gluconobacter* [Deppenmeier *et al.*, 2002]. 7
- Figura 2 - Estrutura da Pirroloquinolina quinona (PQQ) [Duine, 1991; Anthony, 1996]. 9
- Figura 3 - A Entrada do quinato na rota do chiquimato conduzido pela quinoproteína quinato desidrogenase (QDH) [Adachi *et al.*, 2003]. 11
- Figura 4 - Oxidação do etanol de espécies de *Acetobacter* conduzida por ADH e ALDH na cadeia respiratória [Matsushita *et al.*, 2004]. 15
- Figura 5 - A unidade $\alpha\beta$ da metanol desidrogenase simplificada para mostrar a β -folha e a cadeia α da longa α hélix da subunidade β . O grupo prostético PQQ é mostrado na forma de esqueleto e o íon de cálcio é uma pequena esfera [Cozier e Anthony 1995; Anthony, 1996; Anthony e Ghosh 1998; Anthony e Williams 2003]. 19
- Figura 6 - A estrutura modelo da álcool desidrogenase está na região N-terminal da subunidade I do complexo quinhemoproteína ligada a membrana. O grupo prostético PQQ é mostrado na forma de esqueleto e o íon de cálcio é uma pequena esfera [Cozier *et al.*, 1995; Anthony e Ghosh, 1998]. 19
- Figura 7 - Següência de alinhamento da quinoproteína desidrogenases (Anthony *et al.*, 1994; Anthony e Ghosh, 1998). 20
- Figura 8 - Novo anel dissulfeto no sítio ativo da metanol desidrogenase [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003]. 21
- Figura 9 - Coordenação do íon de cálcio e PQQ no sítio tivo da metanol desidrogenase [Cozier e Anthony, 1995; Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams 2003]. 22
- Figura 10 - Coordenação do íon de cálcio e ligação da PQQ no sítio tivo do modelo da álcool desidrogenase [Cozier *et al.*, 1995]. 22
- Figura 11 - Mecanismo da metanol desidrogenase envolvendo formação de um intermediário hemicetal [Anthony 1996; 1997; Anthony *et al.*, 1998; 2003]. 24
- Figura 12 - Um mecanismo de transferência de hidreto alternativo [Anthony, 1996; Anthony *et al.*, 1998; 2003]. 25

Figura 13 -	Cinética hexa-uni ping-pong para oxidação do QH-ADH catalisado de álcool em aldeído por ferricianeto [Machado, 1999].	27
Figura 14 -	Oxidação enantioselectiva do 2-metil-1,3-propanediol proquiral para (<i>R</i>)-3-hidroxi-2-metil por <i>Acetobacter pasteurianus</i> [Molinari <i>et al.</i> , 2003].	29
Figura 15 -	Oxidação enantioselectiva do 1,2-propanediol racêmico para D-(-)-ácido láctico por <i>Gluconobacter oxydans</i> [Wu Su <i>et al.</i> , 2003].	29
Figura 16 -	Publicações anuais de transformação biocatalítica de compostos orgânicos não naturais [Faber, 1997].	30
Figura 17 -	Frequência do uso de enzimas em biotransformações [Faber, 1997].	31
Figura 18 -	Preferência da enzima envolvida na resolução cinética do glicidol na conversão dele em ácido glicídico [Machado <i>et al.</i> , 1999; Weel <i>et al.</i> , 2001].	36
Figura 19 -	Estruturas do glicidol e solketal e dois exemplos de resolução cinética por bactéria [Geerlof <i>et al.</i> , 1994].	37
Figura 20 -	Pedaços do bagaço de cana que recheia os reatores das indústrias de vinagre, inoculados em meio YGA, a 30°C, 48 h.	49
Figura 21 -	Isolado LBVE1, cultivado a 30°C em meio YGA, 30°C por 48 h.	49
Figura 22 -	Isolado LBVE1, cultivado em meio YGA, 30°C por 48h.	49
Figura 23 -	Isolado LBVE2, cultivado a 20 g/L de etanol, 30°C por 48 h.	49
Figura 24 -	Isolado LBVE3, cultivado a 20 g/L de etanol, 30°C por 48 h.	49
Figura 25 -	Morfologia das colônias através de coloração de Gram.	51
Figura 26 -	Produção de biomassa do isolado LBVE1 nos culturas incubados a 30°C por 72 h (inóculo direto). Os valores representados nesta figura são médias de duas amostras.	51
Figura 27 -	Influência de inóculos contendo etanol ou ácido acético na produção de biomassa em culturas de LBVE1 a 30°C por 72 h. Os valores representados são médias de duas amostras. O volume usado no inóculo líquido contendo etanol (2 g/L) corresponde a 5% (v/v).	54

Figura 28 -	Influência de inóculos contendo etanol ou ácido acético na produção de biomassa em culturas de LBVE1 a 35°C por 72 h. Os valores representados são médias de duas amostras. O volume usado no inóculo líquido contendo etanol (2 g/L) corresponde a 5% (v/v).	54
Figura 29 -	Produção de biomassa do isolado LBVE1 a 30°C em relação ao volume do inóculo em etanol.	55
Figura 30 -	Influência da temperatura de incubação nos cultivos de LBVE1 a 20 g/L e duração de 72 h.	56
Figura 31 -	Produção de biomassa do isolado LBVE1 em diferentes concentrações de etanol e temperaturas.	56
Figura 32 -	Produção de biomassa do isolado LBVE4 em diferentes concentrações de etanol e temperaturas.	57
Figura 33 -	Medição do pH para os cultivos dos isolados LBVE1 e LBVE4 em diferentes concentrações de etanol a 30°C.	57
Figura 34 -	Atividade enzimática pela QH-ADH do isolado LBVE1.	58
Figura 35 -	Atividade enzimática pela QH-ADH do isolado LBVE4.	58
Figura 36 -	Atividade Específica pela QH-ADH do isolado LBVE1.	60
Figura 37 -	Atividade Específica pela QH-ADH do isolado LBVE4.	60
Figura 38 -	Constantes cinéticas aparentes de álcool desidrogenase NAD independente presente no extrato bruto do isolado LBVE1, 10 g/L de etanol a 30°C.	66
Figura 39 -	Constantes cinéticas aparentes de álcool desidrogenase NAD independente presente no extrato bruto do isolado LBVE1, 20 g/L de etanol a 30°C.	67
Figura 40 -	Constantes cinéticas aparentes de álcool desidrogenase NAD independente presente no extrato bruto do isolado LBVE4, 10 g/L de etanol a 30°C.	67
Figura 41 -	Constantes cinéticas aparentes de álcool desidrogenase NAD independente presente no extrato bruto do isolado LBVE4, 20 g/L de etanol a 30°C.	68

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 -	Características que diferenciam os gêneros de <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i> de acordo com o Manual de Bacteriologia determinativa de Bergey, 8ª e 9ª Edições [Holt <i>et al.</i> , 1984; 1994].	3
Tabela 2 -	Enzimas envolvidas em biotransformações industriais conforme catalisadas por cepas do gênero <i>Gluconobacter</i> [Deppenmeier <i>et al.</i> , 2002].	8
Tabela 3 -	As desidrogenases primárias envolvidas na oxidação de monossacarídeos e álcoois em bactérias do ácido acético [Matsuschita <i>et al.</i> , 2004].	14
Tabela 4 –	Visão geral das diferentes quinoproteína álcool desidrogenases contendo PQQ existente na natureza [Geerlof, 1994].	17
Tabela 5 –	Diferentes propriedades das quinoproteína álcool desidrogenases contendo PQQ existente na natureza [Geerlof, 1994].	17
Tabela 6 -	Evolução do mercado mundial de drogas quirais (milhões de dólares) [Stinson, 2000].	35
Tabela 7 –	Variação da concentração de proteína totais e atividade específica nos extratos brutos dos isolados LBVE1 e LBVE4.	59
Tabela 8 -	Perfil de especificidade dos extratos da cepa LBVE1 contendo álcool desidrogenase NAD-independente da bactéria do ácido acético para alguns álcoois primários, secundários, terciários racêmicos e aldeídos usando ferricianeto de potássio como acceptor de elétron.	63
Tabela 9 –	Perfil de especificidade dos extratos do isolado LBVE4 contendo álcool desidrogenase NAD-independente da bactéria do ácido acético para alguns álcoois primários e secundários racêmicos usando ferricianeto de potássio como acceptor de elétron.	65

LISTA DE APÊNDICES

	Pág.
A.2.1. Meio de Frauter modificado utilizado para isolamento de espécies do gêneros <i>Acetobacter</i> e <i>Gluconobacter</i> .	85
A.2.2. Meio YGA utilizado para isolamento de espécies das bactérias do ácido acético.	85
A.2.3. Coloração de Gram.	85
A.2.4. Meio de cultura Manitol (meio 360) utilizado para manutenção das cepas (http://www.dzmmz.de/media/med360.htm)	85
A.2.5. Pre-inóculo com etanol como fonte de carbono.	86
A.2.6. Pre-inóculo com ácido acético como fonte de carbono.	86
A.2.7. Meio de Frauter modificado (líquido) utilizado para produção de biomassa.	86
A.2.8. Preparação de tampão fosfato pH 6.0 com concentração de 10mM.	86
A.2.9. Preparação de tampão McIlvaine (I Bial Chen 1921, 491 183 Chen Abs 16-729) pH 4.0.	86
A.2.10. Soluções para quantificação de proteínas.	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
Aox	Álcool oxidase
ARDH	Arabitol desidrogenase
ARG	Arginina
ASP	Aspartato
CaCO ₃	Carbonato de calico
Ca ²⁺	Íon de calico
CIS	Cisteína
DCIP	Diclorofenolindofenol
FAD	Flavina-adenina-nucleotídeo
G	Grama
GADH	Gluconato desidrogenase
GDH	Glicose desidrogenase
GLDH	Glicerol desidrogenase
Gox	Glicose oxidase
H	Hora
Kgf/cm ²	Quilograma Força por cm ²
K _M ^{app}	Constante aparente de Michaelis-Menten
L	Litro
LBVE	Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Enzimologia
LIS	Lisina
MDH	Metanol desidrogenase
Min	Min
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NAD(P)	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
PMS	Fenasina metosulfato
PQQ	Pirroloquinolina quinona (2,7,9-tricarboxy-1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>f</i>]quinolina-4,5-dione)
PQQH2	Forma quinol da PQQ
Q	Ubiquinona
Q-ADH	Quinoproteína álcool desidrogenase
QH-ADH	Quinohemoproteína álcool desidrogenase
Q-QDH	Quinoproteína quinato desidrogenase
SDH	Sorbose desidrogenase
SLDH	Sorbitol desidrogenase
(<i>rac</i>)	Racêmico
(<i>sec</i>)- álcool	Álcool secundário
V _{max} ^{app}	Velocidade máxima aparente de reação
YGA	Meio de cultura (Levedura, glicose e ágar - Yast glucose ágar)

RESUMO

Álcool desidrogenase NAD-independente, enzima ligada a membrana, das espécies *Acetobacter* e *Gluconobacter* mostram apreciável enantioseletividade na oxidação de álcoois quirais primários e secundários. Em estudos anteriores, esta enzima foi isolada e caracterizada de espécies mesofílicas *Acetobacter* sp como uma quinhemoproteína álcool desidrogenase (QH-ADH). QH-ADH mostrou enantiopreferência pela oxidação do (S)-enantiômero durante a resolução cinética de álcoois secundários racêmicos. Devido ao crescente interesse por enzimas termotolerantes na área de biocatálise, este estudo foi conduzido com intuito de isolar bactérias termotolerantes do ácido acético de fábricas de vinagre na região nordeste do Brasil, almejando obter uma QH-ADH termotolerante. Dentre as espécies isoladas, duas mostraram características do gênero *Acetobacter* (LBVE1 e LBVE4). A produção de biomassa foi conduzida em agitador sob aeração de 200 rpm com três diferentes concentrações de etanol (10, 15 e 20 g/L) e incubadas em três temperaturas (30, 35 e 37°C). Os dois isolados apresentaram maior produção de biomassa nas condições quando cultivadas a 20 g/L etanol na 30°C. Todavia, as condições para produção de uma biomassa ativa em álcool desidrogenase NAD-independente variaram para as duas cepas. Cultivos de LBVE1 com 10 g/L de etanol, 30°C, apresentou maior atividade específica cerca de 10,44 U/mgProteína. Enquanto que cultivos de LBVE4 mostrou atividade específica mais alta, 8,04 U/mgP nos cultivos a 15 g/L de etanol, 30°C. As análises para investigar os perfis de especificidades para o substrato nos extratos brutos de LBVE1 e LBVE4, contendo ADH NAD-independente foram realizadas usando álcoois racêmicos com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, dentre eles o rincoforol que é utilizado como feromônio. Também foram medidos os parâmetros cinéticos aparentes nos extratos brutos de ambas as cepas contendo atividade em ADH NAD-independente. Os extratos brutos células de LBVE1 cultivados 10 g/L e 20 g/L etanol apresentaram valores de K_m^{app} e V_{Max}^{app} comparáveis. Contudo, somente os extratos brutos de células de LBVE4 cultivados a 20 g/L etanol tiveram valores de K_m^{app} semelhantes aos encontrados para os extratos de células de LBVE1 estudados.

Palavras-chave: *Acetobacter*, Álcool desidrogenase, oxidoredução

ABSTRACT

Membrane-bound NAD-independent alcohol dehydrogenase (NAD-independent ADH) from *Acetobacter* and *Gluconobacter* species has shown appreciable enantioselectivity on the oxidation of chiral primary and secondary alcohols. A NAD-Independent alcohol dehydrogenase from mesophilic *Acetobacter* sp was isolated and characterized as a quinohaemprotein alcohol dehydrogenase –QH-ADH. QH-ADH showed enantiopreference for the oxidation of (S)-enantiomer during the kinetic resolution of racemic secondary alcohols. Due to the growing interest for thermotolerant enzymes in the biocatalysis area, this study was performed to isolate acetic acid bacteria from vinegar factories in the northeast region of Brazil aiming to obtain a thermotolerant QH-ADH. Among the strains isolated, two showed characteristics of the *Acetobacter* genus (LBVE1 e LBVE4). Biomass production of the two strains were conducted on shaker flasks assays with three different ethanol concentrations as carbon source (10, 15 e 20 g/L) incubated in three different temperatures (30 35 e 37°C). The highest biomass production for the two strains was obtained on the assays with 20 g/L ethanol, 30 °C. However, both strains presented different growth conductions for the production of biomass highly active in NAD-independent ADH. LBVE1 biomass produced on 10 g/L ethanol, 30°C, showed the highest specific activity, 10.44 U/mg Proteín while the highest specific activity for LBVE4, 8.04 U/mg Proteín, was obtained on the biomass produced in assays with 15 g/L ethanol, 30 °C. The results of the substrate specificity of the NAD-independent ADH present in the crude extract of both strains for selected primary and secondary alcohols. For primary alcohols, LBVE1 crude extract showed a decrease in the activity values with the rise of the carbon chain. Kinetic assays were performed to calculate apparent kinetics constants, using ethanol as substrate, for the NAD-independent ADH present in the crude extract of both strains. LBVE1 crude extracts from cells grown in 10 and 20 g/L ethanol showed comparable values for K_m^{app} and V_{Max}^{app} . However, only extract from LBVE4 grown in 20 g/L ethanol had K_m^{app} value comparable to the one found for LBVE1 extracts analyzed.

Keywords: *Acetobacter*, Álcohol dehydrogenase, oxidoreduction

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais sobre as bactérias do ácido acético

1.1. Fontes de obtenção das bactérias do ácido acético

Os habitats e a biologia das bactérias do ácido acético são relativamente bem conhecidos devido aos consideráveis lucros e perdas econômicas que causam na indústria. Na natureza, as bactérias do ácido acético parecem particularmente bem adaptadas a soluções açucaradas ou alcoólicas ou outros nichos que a derivam, tais como, flores, frutas, colméias de abelha, "chás de cogumelo" e vinho de palma [Swings, 1992]. As espécies dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* podem ocorrer naturalmente em flores, frutas, mel de abelha, tequila, vinho de palma, vinho de uva, cidra, cerveja, extrato de levedura de cerveja, saquê, vinagre, raspas de faia (A Faia *Fagus sylvatica* é uma angiospérmica dicotiledônea, Fagáceas <http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=1714&iCanal=1&iSubCanal=3196&iLingua=1>) de geradores de vinagre, caldo de cana-de-açúcar, "chás de cogumelo", bebidas de vegetais com taninos, solo de jardim, etc [Holt *et al.*, 1994].

1.2. Caracterização e diferenciação entre os gêneros das bactérias do ácido acético

A primeira descrição das bactérias do ácido acético foi publicada em 1822 por Person e, desde então, uma extensa literatura sobre esses organismos foi acumulada, conforme descrito por Asai em 1968.

De acordo com a 9ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey [Holt *et al.*, 1994], as bactérias do ácido acético são Gram-negativas, obrigatoriamente aeróbicas e formam um grupo morfológica e fisiologicamente muito heterogêneo. Estas bactérias podem ser divididas em quatro gêneros: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Frateuria* e *Gluconobacter*. Tanto os gêneros *Acetobacter* quanto *Gluconobacter*, pertencem à família Acetobacteraceae. As cepas do gênero *Acetobacter* são mais tolerantes ao etanol que as do gênero *Gluconobacter* [Gosselé *et al.*, 1983], suportando a presença de até 10% de etanol no meio líquido de cultivo [Swings, 1992]. No entanto, a oxidação de glicídeos e atividades cetogênicas das cepas do gênero *Gluconobacter* são altas. A oxidação subsequente do ácido acético tem sido usada para diferenciar os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*

[Swings,1992]. Estas bactérias são responsáveis principalmente pela produção de ácido acético e outros metabólitos prejudiciais em vinhos [González *et al.*, 2004].

Monmangmee *et al.*, [2000] usaram em seus estudos, técnicas laboratoriais de identificação morfológica, fisiológica e bioquímica para as bactérias do ácido acético (**Tabela 1**) de acordo com a 9ª Edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey [Holt *et al.*, 1994]. As bactérias do ácido acético podem ser diferenciadas através de: (a) Formas das células e coloração de Gram; (b) Arranjo dos flagelos e mobilidade; (c) Pigmentação; (d) Formação de ácido acético a partir de etanol; (e) Oxidação de ácido acético e lactato a carbonato; (f) Formação de diidroxiacetona a partir de glicerol; (g) Enriquecimento do meio de cultura com vitaminas; (h) efeitos da temperatura no crescimento; (i) Produção de catálise; (j) Identificação de Ubiquinona; (l) Formação de ácido a partir de pentitols (álcoois de glicídeos) (m) Extração de DNA.

Tabela 1 - Características que diferenciam os gêneros de *Acetobacter* e *Gluconobacter* de acordo com a 8ª e 9ª Edições do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey [Holt *et al.*, 1984; 1994].

Características	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Forma das células	elipsoidal à forma de bastão reto ou ligeiramente curvada	varia de elipsoidal a forma de bastão
Dimensões das células	0.6–0.8 x 1.0–1.4 µm	0.5–1.0 x 2.6–4.2 µm
Motilidade	Sim/Não	Sim/Não
Arranjo dos Flagelos	Peritriquios/Laterais	Polares
Superoxidação em etanol	Sim	Não
Oxidação de lactato para CO ₂ e H ₂ O	Sim	Não
Oxidação de ácido acético para CO ₂ e H ₂ O	Sim	Sim
Fonte de carbono para Crescimento:		
Etanol, Glicerol	Sim	Sim
Manitol	Não	Sim
D-Manose, D-lixose, L-lixose	Não	Não
Ácido acético, Glicerato, Lactato, <i>n</i> -Propanol	Sim/Não	Não
L-Arabinose, Metanol	Não	Não
D-Frutose, D-glicose, Sorbitol	Não	Sim
Hexose, Glicomato	Sim	Não
Meio Hoyer-Frateur	Sim/Não	Não
Cetogênese	Fraca	Forte (poliálcoois)
Produtos formados a partir de D-glicose:		
Ácido 2-Cetoglicônico	Sim/Não	Sim
Ácido 5-Cetoglicônico	Sim/Não	Sim

Características	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Ácido 2,5-Dicetoglicônico	Sim/Não	Sim/Não
Ácidos produzidos a partir de:		
D-Arabinose, D-manitol, D-sorbitol	Não	Sim
<i>i</i> -Inositol, Maltose	Não	Sim/Não
Tempertura ótima para crescimento	30°C	30-33°C
pH ótimo para crescimento	5,4-6,3	5,0
Composição base do DNA:		
(moles % G+C)	53-63	54-63
Tipo de Ubiquinona	Q ₉	Q ₁₀
Tipo de ácidos gráxos celular	C _{18:1}	C _{18:1}

1.3. Características e classificação genética das bactérias do ácido acético

A maior contribuição para a taxonomia das bactérias do ácido acético foi feita por estudos de hibridização de DNA e RNA ribossômico [Gillis e De Ley, 1980]. Uma primeira conclusão deste trabalho foi que as espécies dos gêneros *Gluconobacter* e *Acetobacter* eram grupos intimamente relacionados, justificando sua união na família *Acetobacteraceae* [Swings, 1992]. A abordagem mais recente para a classificação na família *Acetobacteraceae* [Gillis *et al.*, 1989; Mason & Claus, 1989; Urakami *et al.*, 1989; Yamada & Kondo, 1984; Yamada *et al.*, 1997] revela a existência de quatro gêneros bem definidos: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconoacetobacter* e *Gluconobacter*.

Baseado nos dados genéticos, quatro espécies são propostas dentro do gênero *Gluconobacter*, *G. oxydans*, *G. asaii*, *G. cerinus* e *G. frateurii*, as quais foram diferenciadas pelas características fenotípicas [Swings, 1992]. *G. cerinus* e *G. frateurii*, no entanto, são fenotipicamente muito similares. A filogenia molecular baseada em pequenas seqüências de subunidades rRNA provêm relações e classificação dos microrganismos [Woese, 1987; Ludwig, *et al.*, 1994]. A filogenia das espécies *Acetobacter* sp e *G. oxydans* foi examinada por Sievers *et al.*, [1994]. Junto com as espécies *Rhodopila globiformis* e *Acidiphilium* elas representam um grupo de bactérias acidofílicas com uma linha distinta de descendentes na classe da Proteobacteria. Nesse estudo, as seqüências genéticas 16S rRNA da *G. asaii*, *G. cerinus* e *G. frateurii* foram analisadas para determinar os relacionamentos

evolucionários dentro do gênero *Gluconobacter* e a ramificação filogenética em relação a *Acetobacter* [Sievers, 1995].

Takemura *et al.*, [1991] mostraram uma marcante instabilidade genética que tem sido observada nas bactérias do ácido acético. Essa instabilidade causa mutações espontâneas em altas frequências, conduzindo a deficiências em várias propriedades fisiológicas, tais como resistência ao ácido acético e oxidação de etanol [Ohmori *et al.*, 1982]. Em vários fenótipos, estas mutações causam perda atividade catalase; perda e ganho de atividades similares para produzir vários produtos oxidados tais como, gliconato, ceto-gliconato e diidroxiacetona; formação de pigmentos marrons e mudança na morfologia da colônia e na formação de celulose. Um novo elemento na seqüência de inserção, IS1380, foi identificado como o principal fator da instabilidade genética. A inserção e remoção de uma variedade dos elementos (IS) no genoma das bactérias do ácido acético devem ser responsáveis por estas mutações [Beppu, 1993].

Ruiz *et al.*, [2000] avaliaram a utilidade da técnica molecular de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição usando Reação em Cadeia por Polimerase (Restriction Fragment Length Polymorphisms – Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP)) no espaço intergênico 16S rDNA e 16S-23S para caracterizar as bactérias do ácido acético. Essa técnica permitiu-lhes diferenciar os quatro gêneros destas bactérias, bem como identificar isolados naturais a nível de espécie. Os 33 genótipos foram identificados a nível de espécie por PCR-RFLP, a partir do DNA ribossômico 16S. As espécies identificadas foram: *Gluconobacter oxydans*, *Gluconoacetobacter hansenii*, *Ga. Liquefaciens*, *Ga. Xylinus*, *Ga. europaeus* e *Acetobacter aceti*.

González *et al.*, [2004] usaram as técnicas moleculares de Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacterial (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)) e Palíndromos Extragênicos Repetitivo (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR)) para diferenciação de bactérias do ácido acético em fermentação de vinho tinto.

1.4. Aplicações biotecnológicas das bactérias do ácido acético

As bactérias do ácido acético vem sendo usadas desde a antiguidade para a produção empírica de vinagre. Elas também podem ser usadas na conversão

oxidativa de D-sorbitol para L-sorbose [Adachi *et al.*, 2003], que é um importante intermediário na síntese de ácido L-ascórbico (vitamina C). As cepas pertencentes ao gênero *Gluconobacter* oxidam uma ampla gama de monossacarídeos, álcoois e ácidos de glicídeos, como D-frutose, D-glicose, D-sorbitol, D-manitol, glicerol, D-gliconato, ceto-D-gliconatos, ácido cetoglicônico, sorbose e diidroxiacetona, enquanto espécies de *Acetobacter* tem uma forte capacidade de oxidação do etanol [Adachi *et al.*, 1978; Swings, 1992; Yang e Lim 1997; Shinagawa *et al.*, 1999]. A produção de vinagre e biocelulose por espécies do gênero *Acetobacter* é predominante na indústria [Monmangmee, 2000].

As reações catalisadas por desidrogenases primárias localizadas na membrana citoplasmática são acopladas a cadeia respiratória (**Figura 1**) [Matsushita *et al.*, 1994]. Seus sítios ativos são orientados na direção do periplasma, assim, substâncias que são usadas como fonte de energia têm que cruzar a membrana externa; o transporte para dentro do citoplasma não é necessário. Os produtos de oxidação são facilmente liberados no meio via porinas (As porinas correspondem a proteínas formadas por três subunidades idênticas que originam um canal de aproximadamente 1nm de diâmetro, cujo mecanismo de abertura e fechamento permanece ainda desconhecido [<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/nutricao/nutricao.html>]) na membrana externa das bactérias Gram negativas. Para o segundo tipo de sistema enzimático, a absorção do substrato na célula é requerido. Os substratos são oxidados por enzimas NAD(P)⁺-dependente (**Figura 1**). E os intermediários resultantes são fosforilados e metabolizados pela rota das pentoses fosfato [Deppenmeier *et al.*, 2002]. Assim estas bactérias possuem várias desidrogenases ligadas a membrana e várias outras desidrogenases citossólicas (**Figura 1**) que por suas interessantes aplicações tecnológicas vem sendo caracterizadas e isoladas [Deppenmeier *et al.*, 2002].

Um número crescente de estudos vem sendo realizados para o isolamento de novas cepas termotolerantes como também estudos de mutagênese de cepas nativas objetivando o enriquecimento da produção das enzimas chaves tais como as enzimas envolvidas na produção de 5-ceto-gliconato [Klasen *et al.*, 1995].

Algumas espécies de *Gluconobacter* termotolerantes estão envolvidas nas oxidações de álcoois cíclicos e produção de L-eritrose, como a *G. frateurii* CHM 43 é capaz de oxidar rapidamente *meso*-eritritol para L-eritrose que tem aplicação na composição de cosméticos podendo substituir a diidroxiacetona, enquanto a *G.*

frateurii CHM 9 é capaz de oxidar álcoois cíclicos para cetonas cíclicas ou alifáticas correspondentes, que são úteis na preparação de compostos fisiológicos ativos com esteróides oxidados e cetonas bicíclicas [Adachi *et al.*, 2003]. A *A. pasteurianus* foi capaz de oxidar enantioselectivamente álcoois secundários e glicidol [Machado *et al.*, 1999a]. A L-riboluse é um importante componente intermediário da rota para L-ribose, uma importante matéria-prima para drogas antivirais. A conversão de L-riboluse para ribitol é mais convenientemente feita por células de *A. acetii* IFO 3281 [Kylmä *et al.*, 2004].

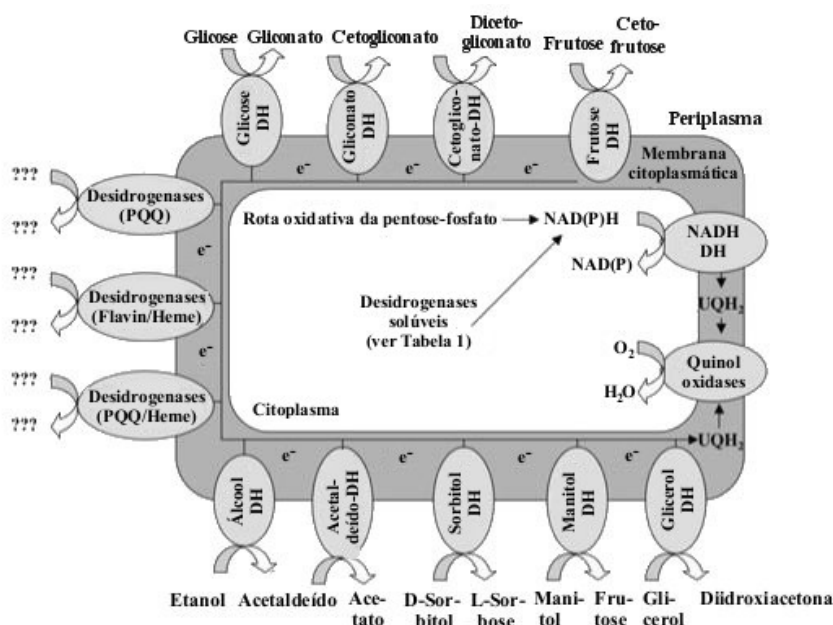


Figura 1 - Sistemas enzimáticos de oxidação de álcoois e monossacarídeos em espécies do gênero *Gluconobacter* [Deppenmeier *et al.*, 2002].

1.5. Enzimas chaves de bactérias do ácido acético envolvidas em biotransformação

Durante a última década uma série de desidrogenases ligadas à membrana envolvidas na oxidação de substratos tem sido identificadas e caracterizadas (**Figura 1; Tabela 2**). Mais importantes são glicose, frutose, álcool, aldeído, sorbitol e glicerol desidrogenases, as quais contêm grupo prostético pirroloquinolina quinona (PQQ) (**Figura 2**). Em adição, álcool, aldeído, frutose e sorbitol desidrogenases são equipadas com subunidades contendo heme *c*. Ainda mais, flavin-dependente desidrogenases tem sido descrita que oxidam gliconato, ceto-gliconato, sorbitol e sorbose. Algumas contêm também citocromo *c* (**Tabela 2**). [Deppenmeier *et al.*, 2002].

Tabela 2 – Enzimas envolvidas em biotransformações industriais conforme catalisadas por cepas do gênero *Gluconobacter* [Deppenmeier *et al.*, 2002].

Enzimas	Substratos	Produtos	Localização	Grupos Prostético e Cofator	Referências
Álcool desidrogenase	Etanol	Acetaldeído	Membrana	PQQ, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1999
Álcool desidrogenase	Etanol	Acetaldeído	Citoplasma	NADP ⁺	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Acetaldeído desidrogenase	Acetaldeído	Ácido acético	Membrana	PQQ, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Acetaldeído desidrogenase	Acetaldeído	Ácido acético	Citoplasma	NADP ⁺	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Glicose desidrogenase	Glicose	D-glicono- δ -lactato	Membrana	PQQ	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Glicose desidrogenase	Glicose	D-glicono- δ -lactato	Citoplasma	NADP ⁺	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Gliconato desidrogenase	Gliconato	5-cetogliconato	Citoplasma	NADP ⁺	Klasen <i>et al.</i> , 1995
Gliconato desidrogenase	Gliconato	5-cetogliconato	Membrana	PQQ	Shinagawa <i>et al.</i> , 1999
Gliconato desidrogenase	Gliconato	2-cetogliconato	Membrana	Flavin, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
2-cetogliconato redutase	2-cetogliconato	Gliconato ?	Citoplasma	NADPH	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
2-cetogliconato desidrogenase	2-cetogliconato	2,5-Dicetogliconato	Membrana	Flavin, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Glicerol desidrogenase	Glicerol	Diidroxiacetona	Membrana	PQQ	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
Frutose desidrogenase	Frutose	5-ceto-D-frutose	Membrana	PQQ, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
5-ceto-D-frutose redutase	5-ceto-D-frutose	Frutose	Citoplasma	NADPH	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
D-Sorbitol desidrogenase	D-Sorbitol	L-Sorbose	Membrana	PQQ, heme c	Choi <i>et al.</i> , 1995
D-Sorbitol desidrogenase	D-Sorbitol	L-Sorose	Membrana	Flavin, heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
D-Sorbitol desidrogenase	D-Sorbitol	L-Sorbose	Membrana	n.d.	Sugisawa e Hoshito 2002
D-Sorbitol desidrogenase	D-Sorbitol	L-Sorbose	Citoplasma	NADP ⁺	Shibata <i>et al.</i> , 2000
L-Sorbose desidrogenase	L-Sorbose	L-Sorbosone	Membrana	Flavin	Sugisawa <i>et al.</i> , 1991
L-Sorbose redutase	L-Sorbose	L-Sorbitol	Citoplasma	NADPH	Sugisawa <i>et al.</i> , 1991
L-Sorbose redutase	L-Sorbose	L-Sorbitol	Citoplasma	NADPH	Adachi <i>et al.</i> , 1999
L-Sorbose redutase	L-Sorbose	L-Sorbitol	Citoplasma	NADPH	Shijoh <i>et al.</i> , 2002
Sorbose/sorbosone desidrogenases	L-Sorbose	L-Sorbosone	Periplasma	PQQ	Asakura e Hoshino <i>et al.</i> , 1999

Enzimas	Substratos	Produtos	Localização	Grupos Prostético e Cofator	Referências
	L-Sorbosone	2-ceto ácido glucônico			
Manitol desidrogenase	Manitol	Frutose	Citoplasma	NADP ⁺	Adachi <i>et al.</i> , 1999
Manitol desidrogenase	Manitol	Frutose	Membrana	Heme c	Matsushita <i>et al.</i> , 1994
L-Sorbosone desidrogenase	L-Sorbosone	2-ceto ácido glucônico	Citoplasma	NAD(P) ⁺	Hoshino <i>et al.</i> , 1994
D-Arabitól desidrogenase	D-Arabitól	D-Xilulose	Membrana	PQQ	Adachi <i>et al.</i> , 2001
Álcool Cíclico desidrogenase	Álcoois Cíclico	Cetonas Cíclicas	Membrana	PQQ	Monmamgme <i>et al.</i> , 2001
L-Glicono-lactato desidrogenase	L-Glicono- γ -lactato	L-Ascorbato	?	Heme c	Sugisawa <i>et al.</i> , 1995

As enzimas D-gliconato e D-sorbitol desidrogenases isoladas há duas décadas são flavoproteínas, enquanto que a enzima envolvida na oxidação de glicose para D-gliconato e D-sorbitol mostrou ser uma quinoproteína. Assim, as flavoproteínas D-gliconato e D-sorbitol desidrogenases produzem 2-ceto-D-gliconato e D-frutose, enquanto que as quinoproteínas produzem 5-ceto-D-gliconato e L-sorbose, usando os mesmos substratos das flavoproteínas [Adachi *et al.*, 2003]. A enzima D-sorbitol desidrogenase contribui para a produção de L-sorbose e é quinoproteína com pirroloquinolona quinona [Adachi *et al.*, 2003] (PQQ, 2,7,9-tricarboxi-1*H*-pirrolo[2,3-*f*]quinolona-4,5-diona) como coenzima funcional [Duine *et al.*, 1987; Anthony, 1996] (**Figura 2**).

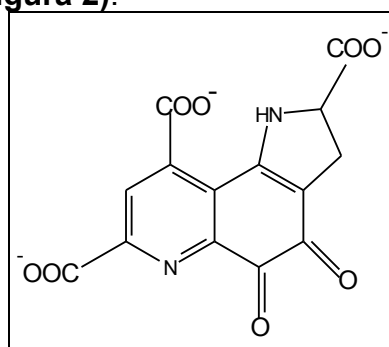


Figura 2 - Estrutura da pirroloquinolona quinona (PQQ) [Duine, 1991; Anthony, 1996].

A enzima D-sorbitol desidogenase alternativa contendo flavina-adenina-dinucleótido (FAD) como coenzima, ligada covalentemente, é capaz de catalisar oxidação de D-

sorbitol a D-frutose. Essa nova descoberta conduziu maior produção de xarope de D-frutose [Adachi *et al.*, Japanese Patent Application, 2001, 358707, 2003].

As enzimas envolvidas nas oxidações do *meso*-eritritol e álcoois cíclicos são similares às quinoproteínas de membrana, com alto peso molecular e uma única cadeia peptídica, diferentemente da quinoproteína ADH de membrana das bactérias do ácido acético que possui três subunidades incluindo as hemoproteínas [Adachi *et al.*, 2003]. As quinohemoproteínas de membrana ADH e ALDH, produzem ácido acético a partir de etanol por duas reações de oxidações sequenciais [Matsushita *et al.*, 1994].

Piyawan *et al.*, [2003] purificaram e caracterizaram duas ADHs NAD-dependentes da cepa mutante de *A. pasteurianus* CN6-2, observando reações de oxidação para álcoois primários, secundários e cíclicos e aldeídos. As desidrogenase D-manitol NAD-dependente (EC 1.1.1.138) e desidrogenase D-manitol NAD-dependente (EC 1.1.1.67) foram purificadas da fração citossólica da *G. suboxidans* IFO 12528 [Adachi *et al.*, 2003].

Em estudos sobre a poliálcool desidrogenase ligada à membrana (experimentalmente designada como D-arabitol desidrogenase, ARDH) verificou-se que a mesma é versátil quanto à oxidação de vários álcoois aldoses nos seus produtos de oxidação correspondentes, tais como gliceraldeído em diidroxiacetona, ribitol em L-ribulose, D-arabitol em D-xilulose, D-sorbitol em L-sorbose e D-manitol em D-frutose [Adachi *et al.*, 2001]. A ARDH mostrou-se uma quinoproteína típica [Adachi *et al.*, 2001].

As enzimas envolvidas no metabolismo do ácido acético nestas bactérias podem ser usadas na sua forma livre ou imobilizada para a catálise de reações específicas. Assim, Cho *et al.*, [1990] e Oikawa *et al.*, [1997] purificaram e caracterizaram a quinohemoproteína D-manitol desidrogenase (EC 1.1.2.2) da *G. melanogenus* e *Ga. xilinus*, respectivamente.

A descoberta da quinoproteína quinato desidrogenase de membrana em bactérias do ácido acético, conduz à rota do chiquimato, produção de 3-desidroquinato por oxidação fermentativa, leva a produção de chiquimato em escala industrial. Esta enzima pode ser útil na produção de chiquimato, que é um importante precursor para síntese de antibióticos, herbicidas e aminoácidos aromáticos. A 3-desidrogenase oxidada por quinoproteína quinato desidrogenase é convertida em chiquimato pelas células imobilizadas dessas bactérias. A D-glicose

desidrogenase NAD-dependente atua como geradora de NADPH e conduz o sistema a produzir chiquimato (**Figura 3**) [Adachi *et al.*, Japanese Patent Application, 2001, 267257, 2003]. Esse achado levou ao renascimento da cinchona na agricultura de áreas tropicais, garantindo o suprimento de quinato no futuro.

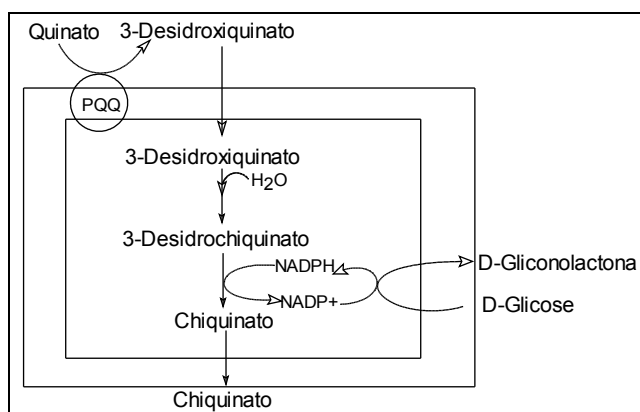


Figura 3 - A entrada do quinato na rota do chiquimato conduzido pela quinoproteína quinato desidrogenase (QDH) [Adachi *et al.*, 2003].

1.6. Aplicação de enzimas em biossensores

A bioeletrocatalise mediada é uma reação muito útil para o estudo da cinética de transferência de elétrons das enzimas e uma reação chave na aplicação de enzimas em biossensores, biorreatores e células de biocombustível, permitindo até medidas de reações catalíticas de células bacteriais intactas que contêm quinoproteínas ou quinohemoproteínas. No caso das quinohemoproteínas, a transferência direta de elétrons bem como a transferência mediada de elétrons é possível entre a enzima e um eletrodo, onde o grupo heme nestas proteínas funciona como um mediador embutido na reação enzimática-eletróquímica [Ikeda *et al.*, 2003].

A alta seletividade inerente aos biossensores resultou no desenvolvimento relativamente precoce de eletrodos amperométricos de etanol baseados em enzimas redox [Niculescu *et al.*, 2002]. Muitos sensores amperométricos de glicose e etanol são baseados ou em glicose oxidase (GOx) e álcool oxidase (AOx), ou em desidrogenases NAD-dependente (GDH e ADH) [Razumiene *et al.*, 2001]. A principal desvantagem dos biossensores baseados em GOx ou AOx é sua dependência de oxigênio, que causa severos problemas especialmente em aplicação *in vivo*. A fabricação de sensores baseados em grupo

de NAD-GDH ou NAD-ADH é bem complicada devido à coenzima NAD precisar ser regenerada para o funcionamento desses eletrodos. Já as desidrogenases PQQ-dependente (ADH e GDH) tem seu cofator ligado dentro do centro catalítico [Razumiene *et al.*, 2001].

Entretanto, apesar de sua baixa estabilidade geral, as álcoois oxidases são também cataliticamente ativas para uma gama de álcoois alifáticos de cadeia curta, incluindo o metanol, enquanto que o álcool desidrogenase NAD⁺-dependente é mais seletiva para álcoois alifáticos e aromáticos primários que não o metanol [Niculescu *et al.*, 2002]. As enzimas álcool desidrogenases PQQ-dependente são interessantes não apenas devido a sua independência do oxigênio mais também porque algumas são capazes de realizar uma transferência direta de elétrons entre seu sítio ativo e certos eletrodos, tornando mais simples a construção de biossensores baseados em tais enzimas [Niculescu *et al.*, 2002].

A glicose desidrogenase-mGDH tem grande potencial de aplicação na área de biossensores para monitoramento de glicose pacientes diabéticos; apresentando a grande vantagem de não ser sensível ao oxigênio como a glicose oxidase (GOx) já empregada em biossensores de glicose [Matsushita e *et al.*, 2002].

Os biossensores contendo GDH ou ADH PQQ-dependente foram construídos para medir concentrações de glicose e etanol em bebidas. A detecção de etanol em dados de vinhos mostrou ótima oportunidade para a aplicação de sensor baseado em ADH [Razumiene *et al.*, 2001]. Niculescu *et al.*, [2002] desenvolveram e otimizaram biossensores amperométrico baseados em quinhemoproteín álcool desidrogenase (QH-ADH) integrada a um sistema hidrogel-redox, onde os biossensores desenvolvidos foram integrados em um analisador automático e aplicado com sucesso para o controle on-line da fermentação de vinho sob condições industriais.

2. As desidrogenases produzidas por Bactérias do Ácido Acético

2.1. Desidrogenases NAD-dependente e NAD-independente

Dois grupos bem diferentes de desidrogenases existem nos organismos vivos: um deles solúvel contendo enzimas dependentes de NAD e NAD(P) e outro com alta insolubilidade que são independentes de NAD e NAD(P) ligadas à

membrana celular, fazendo parte da cadeia de transporte de elétrons. Este último grupo parece ter um papel dominante nas etapas da oxidação incompleta do etanol para acetaldeído e de acetaldeído para ácido acético e de glicose para gliconato, e deste para 2-ceto-gliconato, e deste para 2,5-diceto-gliconato [Machado *et al.*, 1999]. Adachi *et al.*, [2001] mostrou que a oxidação de ribitol é conduzida por duas diferentes enzimas; uma enzima citossólica NAD(P)-dependente e outra enzima ligada a membrana NAD(P)-independente. Das duas enzimas distintas nessa bactéria, apenas a desidrogenase ligada à membrana é responsável pela fermentação oxidativa para o acúmulo de produtos de oxidação úteis no meio de cultura [Adachi *et al.*, 2003]

A oxidação do substrato pelas desidrogenases ligadas à membrana é acoplada à cadeia respiratória dos organismos e os elétrons gerados são transferidos à oxidase terminal produzindo energia de oxidação. Assim, formam um mecanismo específico para a oxidação do substrato com um sistema oxidase desidrogenase-dependente ligado à membrana. Por outro lado, as desidrogenases NAD(P)-dependentes não dão nenhuma contribuição à fermentação oxidativa [Matsushita *et al.*, 1994]. Essas bactérias também possuem desidrogenases NAD(P)-dependente citoplasmáticas tais como: D-glicose desidrogenase e 2-ceto-D-gliconato redutase. As desidrogenases NAD(P)-independente ligadas a membrana, são as enzimas diretamente envolvidas no metabolismo degradativo da glicose, tais como glicose desidrogenase-mGDH, gliconato desidrogenase-GADH e gliconato desidrogenase-GADH. As oxirredutases encontradas em *Acetobacter* são NAD-independentes apresentando vantagens sobre as atualmente disponíveis no mercado, as NAD-dependentes, que apresentam alto custo no mercado e a necessidade de contínua renovação do NAD. Além disso, por ser uma enzima de membrana não necessita de transporte de substâncias para o citoplasma pois catalisa reações no espaço periplasmático, lançando no meio externo os produtos de sua oxidação [Tayama, *et al.*, 1989; Machado, *et al.*, 1999a].

As reações de oxidação de monossacarídeos e álcoois nessas bactérias são unicamente conduzidas por desidrogenases primárias localizadas no lado periplasmático da membrana citoplasmática e ligada para as ubiquinol oxidase(s) terminal (citocromo *o*, citocromo *a*₁, citocromo *d* e CN-resistente) via ubiquinona na cadeia respiratória. As desidrogenases primárias incluem quinoproteínas e

complexos quinoproteína-citocromo *c*, e complexos flavoproteína-citocromo *c* (Tabela 3) [Matsushita *et al.*, 2004].

Tabela 3 - Características gerais de diferenciação e singularidades de algumas desidrogenases primárias [Matsushita *et al.*, 2004].

Enzimas	Estrutura Subunidade e Grupos Prostéticos	Fonte Bacterial	Referências
<i>Quinoproteínas</i>			
Glicose Desidrogenase (GDH)	80 Kd (PQQ)	<i>G. suboxydans</i> ¹	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹
Glicerol desidrogenase (GLDH)	80 Kd (PQQ), ~14 Kd	<i>G. industrius</i> ² , <i>G. suboxydans</i> ^{3,4}	Ameyama <i>et al.</i> , (1985) ² ; Adachi <i>et al.</i> , (2001) ³ ; Sugisawa e Hoshino (2002) ⁴
Álcool Desidrogenase (ADH)	72 Kd (PQQ/heme <i>c</i>), 48 Kd (3 hemes <i>c</i>), ~15 Kd	<i>G. suboxydans</i> ¹ , <i>A. acetii</i> ¹ , <i>A. polyoxygenus</i> ¹ , <i>A. pasteurianus</i> ⁵ , <i>A. methanolicus</i> ⁶	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹ Takemura <i>et al.</i> , (1994) ⁵ Frébotova <i>et al.</i> , (1997) ⁶
<i>Flavoproteínas</i>			
Gliconato Desidrogenase (GADH)	64 Kd (FAD), 45 Kd (hemes <i>c</i>), ~21 Kd	<i>G. dioxycetonicus</i> ¹	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹
2-Cetogliconato desidrogenase (2KGDH)	61 Kd (FAD), 47 Kd (hemes <i>c</i>), ~25 Kd	<i>G. melanogenus</i> ¹	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹
Sorbitol Desidrogenase (SLDH)	63 Kd (FAD), 51 Kd (hemes <i>c</i>), ~17 Kd	<i>G. suboxydans</i> var. α ¹	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹
Sorbose desidrogenase (SDH)	58 Kd (FAD)	<i>G. oxydans</i> ¹	Matsushita <i>et al.</i> , (1994) ¹

2.2. Aspectos gerais das álcool desidrogenases primárias

Quinoproteínas são originalmente definidas como desidrogenases bacteriais contendo PQQ [Machado *et al.*, 1999]. O termo quinoproteína foi criado em 1979 por Duine e Frank, para incluir desidrogenases que contenham, como seu grupo prostético, pirroloquinolina quinona (PQQ). Quinoproteínas são enzimas cujos mecanismos catalíticos envolvem grupos protéticos contendo quinona em seus sítios ativos; esses podem ser ligados não-covalentemente ou derivados dos aminoácidos no esqueleto da proteína [Anthony, 1996]. Esta ligação pode ser rompida por

desnaturação da proteína. Todos os outros cofatores quinonas encontrados até agora são originados de aminoácidos aromáticos constituintes das proteínas e que sofrem oxidação [Machado *et al.*, 1999].

Machado *et al.*, [1999] classificam dois grupos principais de ADHs: (a) as quinoproteínas ADHs, consistindo em desidrogenases solúveis nas quais o PQQ funciona como cofator único; (b) as quinohemoproteínas ADHs, consistindo em desidrogenases solúveis (tipo I) ligadas à membrana e (tipo II) nas quais o PQQ, bem como o heme *c*, participam como cofatores no mecanismo catalítico. A ADH é um complexo citocromo *c* quinohemoproteína ligada ao lado periplásmico da membrana citoplasmática e funciona como uma desidrogenase primária para a etanol oxidase na cadeia respiratória, onde a ADH oxida o etanol pela transferência de elétrons para ubiquinona aprisionada nos fosfolipídeos da membrana (**Figura 4**) [Matsushita *et al.*, 1996; 1999; 2004].

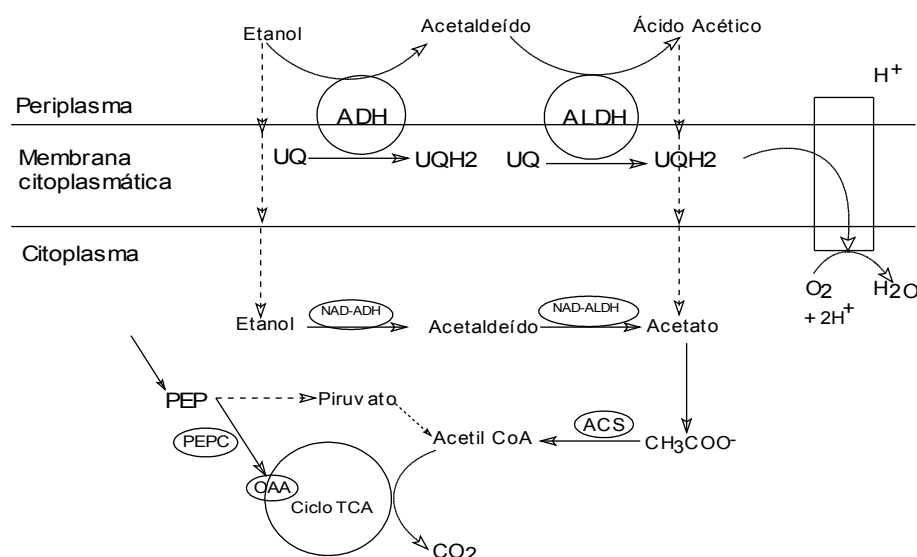


Figura 4 - Oxidação do etanol de espécies de *Acetobacter* conduzida por ADH e ALDH na cadeia respiratória (Matsushita *et al.*, 2004).

A QH-ADH tipo II tem uma ampla especificidade para substratos, oxidando uma vasta gama de álcoois primários bem como secundários e também aldeídos. Dependendo da fonte da qual a enzima é isolada, existem variações com respeito ao metanol, acetaldeído e oxidação de álcoois secundários [Machado *et al.*, 1999].

A ADH de bactérias do ácido acético consiste tipicamente de uma subunidade desidrogenase (subunidade I, 72-80 kDa), uma subunidade citocromo *c*

(subunidade II, 44-54 kDa) e uma pequena subunidade III (8-20 kDa). A ADH contém dois diferentes tipos de cofator, PQQ e múltiplos hemes *c*. PQQ e um heme *c* estão presentes na subunidade I, enquanto os outros hemes *c* na subunidade II. A subunidade III mostrou ser essencial para a expressão da enzima ativa e detectável como forma livre no periplasma além do complexo enzimático [Frébortova *et al.*, 1998]. A localização periplasmática de todas as subunidades (*adhAB* e *adhS*), a presença de PQQ e heme *c* na subunidade I (*adhA*) e mais 3 hemes *c* na subunidade II (*adhB*) foram confirmados por dados genéticos [Matsushita *et al.*, 2004]. Matsushita *et al.*, [1996] em seus estudos sobre a ADH, indicaram que a subunidade I da ADH é uma quinohemoproteína que contém uma molécula de PQQ e heme *c*, que a subunidade II contém três grupamentos heme *c* que são responsáveis pela redução da ubiquinona e que quatro sítios heme *c* da ADH estão separadamente envolvidos nas várias atividades de ferricianeto redutase no complexo ADH.

2.3. Homologia

As enzimas NAD(P)-independentes incluem metanol desidrogenase (MDH) de bactérias metilotróficas e a quinohemoproteína álcool desidrogenase (ADH) das bactérias do ácido acético [Cozier *et al.*, 1995]. As quinohemoproteínas ADHs isoladas das membranas dessas bactérias e as GDHs ligadas à membrana ocorrem em muitas outras bactérias, incluindo *Acinetobacter calcoacticus*, bactérias entéricas e *Pseudomonas*. A GDH é uma proteína integral de membrana que transfere elétrons diretamente à ubiquinona [Anthony *et al.*, 1994]. A MDH é uma enzima periplásmica solúvel, tendo citocromo c_L como receptor de elétrons, enquanto na ADH os elétrons são transferidos da PQQH₂ para o heme *c* na subunidade quinohemoproteína (subunidade I), e dali para a subunidade citocromo *c* e desta para ubiquinona na membrana [Cozier *et al.*, 1995].

Há três tipos de álcool desidrogenases contendo PQQ que são distintos da metanol desidrogenase [Matsushita *et al.*, 1993], mas todos contêm um íon de cálcio e os intermediários reduzidos de seus mecanismos são provavelmente similares. O primeiro tipo, tal como aquele na *Pseudomonas aeruginosa*, é quase idêntico com à metanol desidrogenase, exceto por sua especificidade de substrato [Anthony, 1996]. Os outros tipos são quinohemoproteínas, tem um acceptor de elétrons embutido na forma de heme *c* (**Tabelas 4 e 5**) [Anthony, 1996].

Tabela 4 – Visão geral das diferentes quinoproteína álcool desidrogenases contendo PQQ existente na natureza [Geerlof, 1994].

Enzimas	Coenzimas ou Cofator	Fontes	Referências
MDH	PQQ	Bactérias metilotrópicas	Anthony (1982)
ADH	PQQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Acidophila</i>	Groen <i>et al.</i> , (1984); Rupp & Görisch (1988); Duine & Frank (1981); Görisch & Rupp (1989); Bamforth & Quayle (1978;1979)
QH-ADH (tipo I)	PQQ, heme c	<i>Comamonas testosteroni</i>	Groen <i>et al.</i> , (1986)
QH-ADH (tipo II)	PQQ, heme c	Bactérias do ácido acético	Ameyama & Adachi (1982)

Tabela 5 – Diferentes propriedades das quinoproteína álcool desidrogenases contendo PQQ existente na natureza [Geerlof, 1994]

Enzimas	Solúvel ou Membrana	Estrutura		Grupos Prostéticos	Íon Metal
		Subunidades	(KDa)		
MDH	Solúvel	$\alpha_2\beta_2$	60 (α) 8.5 (β)	PQQ	Ca ²⁺
ADH	Solúvel	$\alpha_2\beta_2$	60 (α) 9 (β)	PQQ	Ca ²⁺
QH-ADH (tipo I)	Solúvel	α	67	PQQ heme c	Ca ²⁺
QH-ADH (tipo II)	Membrana	$\alpha\beta\gamma$	72-80 (α) 48-53 (β) 14-17 (γ)	PQQ (α) 3 heme c ($\alpha+\beta$)	Ca ²⁺

A quinohemoproteína álcool desidrogenase das bactérias do ácido acético enzima de membrana, contém três tipos de subunidade, mas nenhuma subunidade equivalente à pequena subunidade β da metanol desidrogenase [Matsushita e Adachi 1993; Matsushita *et al.*, 1994]. A seqüência primária da subunidade catalítica mostra a região N-terminal (600 resíduos) com uma extensão C-terminal adicional contendo um sítio ligado ao heme [Inoue *et al.*, 1989; 1990]. Na região do N-terminal há uma identidade de 31% com a seqüência da metanol desidrogenase (**Figuras 5 e 6**) [Cozier *et al.*, 1995]. As regiões com maior similaridade seqüencial são as oito regiões folhas β (os agrupamentos W ou lâminas propelentes), Essas conformações de folhas β e agrupamentos W são unidas por agrupamentos de triptofano feitos de seqüências consensuais de 11 resíduos [Cozier e Anthony, 1995]. Estes formam um

cinturão que estabiliza as interações ao redor da periferia da subunidade [Ghosh e Anthony, 1998]. Apesar de haver consideráveis diferenças nos lops externos, particularmente os envolvidos na formação do túnel raso que conduz ao sítio ativo, a região do sítio ativo, foi altamente conservada, incluindo o triptofano e o anel do dissulfeto em lados opostos do plano da PQQ (**Figuras 8**) como também a maioria das cordenações equatoriais para a PQQ (**Figura 9**). [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003] Especialmente importante com respeito ao mecanismo é a conservação da base do sítio ativo (Asp-303 na metanol desidrogenase e Asp-308 na álcool desidrogenase) e de todas as cordenações ao íon do cálcio (**Figuras 9 e 10**). Isto sugere que o mecanismo desta álcool desidrogenase é essencialmente similar àquele da metanol desidrogenase. A comparação da seqüência da proteína da etanol desidrogenase quinhemoproteína solúvel da *Comomonas testosteroni* com aquela da metanol desidrogenase conduz a uma conclusão similar para essa enzima [Storvogel *et al.*, 1996].

Kondo *et al.*, [1995] descreveram as subunidades constituintes da ADH: a subunidade I – chamada de subunidade catalítica, uma vez que contém PQQ e parte da proteína mostra alta similaridade seqüencial com a subunidade α da MDH. A seqüência da outra parte exibindo alta similaridade com o citocromo c_{555} da bactéria metilotrófica *Methylococcus capsulatus*, também mostrando o sítio de ligação para o heme *c*, o outro cofator desta subunidade; a subunidade II – contém três hemes *c* e o sítio de ligação para a ubiquinona. Foi relatado que um dos hemes *c* é modificado na enzima inativa presente em certas condições de cultivo; e a subunidade III – esta não foi encontrada na preparação purificada da enzima *A. polyoxogenes*.

A metanol desidrogenase foi determinada por difração de raio X (**Figura 5**) [Cozier *et al.*, 1995; Antony e Williams, 2003]. A estrutura modelo da álcool desidrogenase (**Figura 6**) está na região N-terminal da subunidade I do complexo quinhemoproteína ligada a membrana isolada de bactérias do ácido acético (resíduos 1-590) [Cozier *et al.*, 1995]. As regiões de folhas β (os agrupamentos W ou lâminas propelentes) são denominadas folhas A-D, com a folha A sendo a mais próxima do eixo de simetria. Os maiores lops (em preto) são: a) resíduos 201-243 (MDH) e 205-245 (ADH); b) resíduos 352-386 (MDH) e 356-389 (ADH); c) resíduos 415-451 (MDH) e 418-460 (ADH); d) resíduos 537-570 (MDH) e 546-565 (ADH).

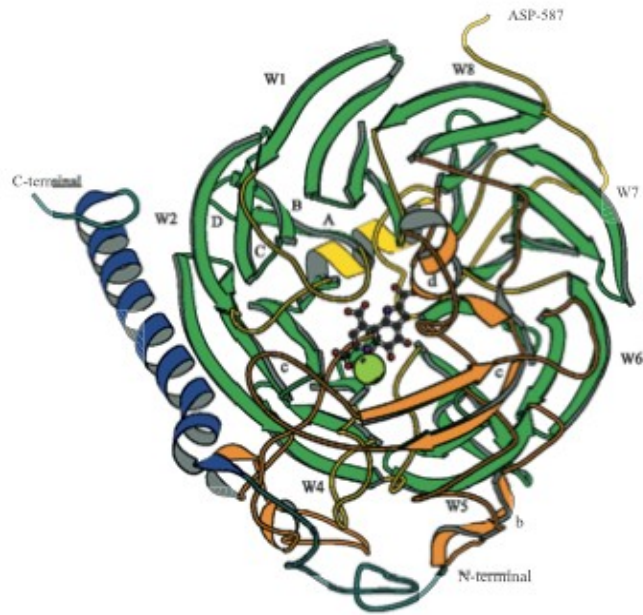


Figura 5 - A unidade $\alpha\beta$ da metanol desidrogenase simplificada para mostrar a folha β e a cadeia α da longa α hélix da subunidade β . O grupo prostético PQQ é mostrado na forma de esqueleto e o íon de cálcio é uma pequena esfera [Cozier e Anthony 1995; Anthony, 1996; Anthony e Ghosh 1998; Anthony e Williams 2003].

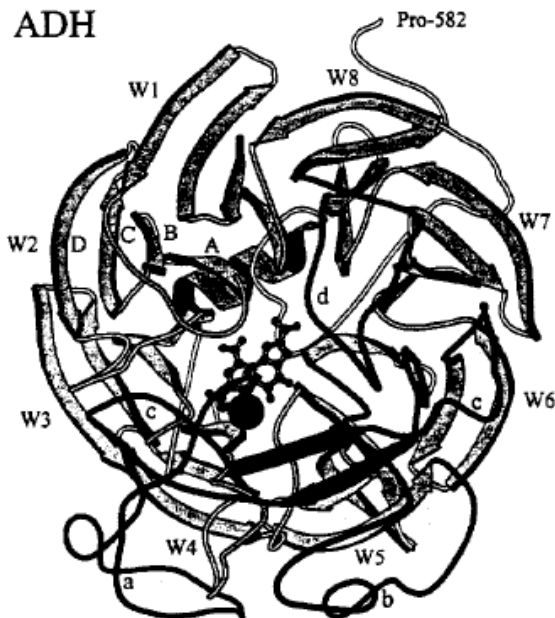


Figura 6 - A estrutura modelo da álcool desidrogenase. O grupo prostético PQQ é mostrado na forma de esqueleto e o íon de cálcio é uma pequena esfera [Cozier *et al.*, 1995; Anthony e Ghosh, 1998].

Isto é apoiado pela observação de que o padrão dos resíduos de triptofano e glicina, que são importantes na interação com as folhas D de lâminas

propelantes adjacentes, é altamente conservado nas três enzimas. As folhas D nas quais faltam o potencial para estas bandas estão em regiões com menor similaridade seqüencial geral (D5/D6-D8 na ADH) e (D5-D7 na GDH) (**Figura 7**) [Anthony *et al.*, 1994; Anthony e Ghosh, 1998].

Em adição à região superbarril de cerca de 600 aminoácidos, a ADH tem uma extensão C-terminal que inclui o sítio heme *c* e que mostra alguma similaridade na seqüência do citocromo *c_L* (**Figura 7**) [Anthony *et al.*, 1994].

Dentro da subunidade α há uma notável estrutura nova derivada da formação de uma ligação de dissulfeto entre resíduos de cisteína adjacentes (Cis 103-Cis-104); o resultado é um anel tensionado de 8 membros (**Figura 8**) [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003]. Apesar de ter sido proposto que tal ligação de dissulfeto está presente no sítio ativo do receptor acetilcolina [Kao e Karlin, 1986] e na estrutura de uma forma inativa e oxidada da íon mercúrico reductase [Schiering *et al.*, 1991], esta é a primeira vez que esta estrutura foi vista numa enzima ativa [Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams 2003].

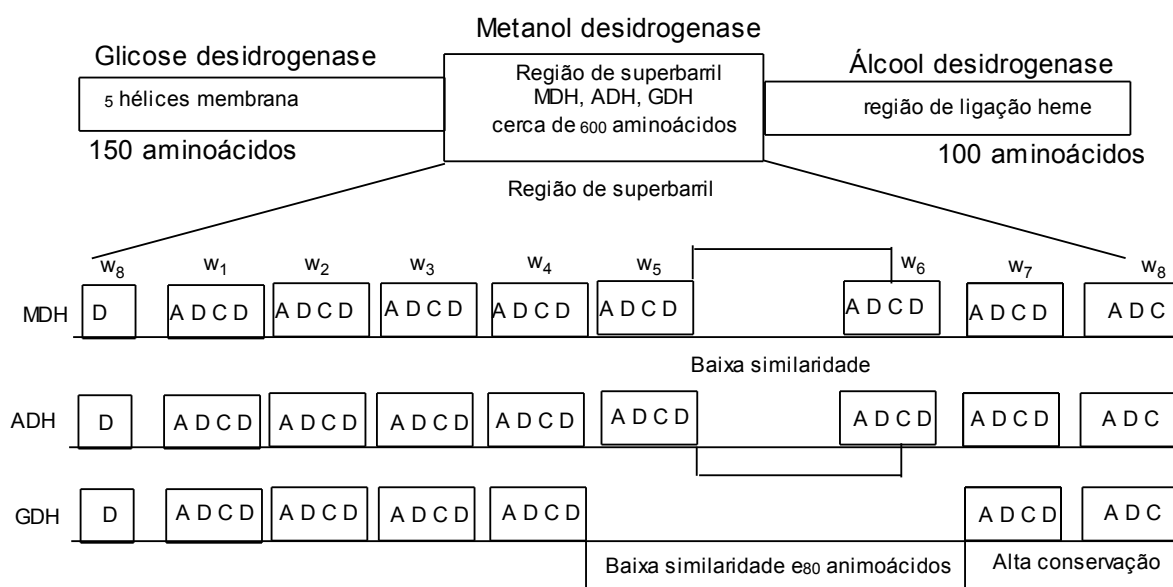


Figura 7 - Seqüência de alinhamento da quinoproteína desidrogenases [Anthony *et al.*, 1994; Anthony e Ghosh, 1998].

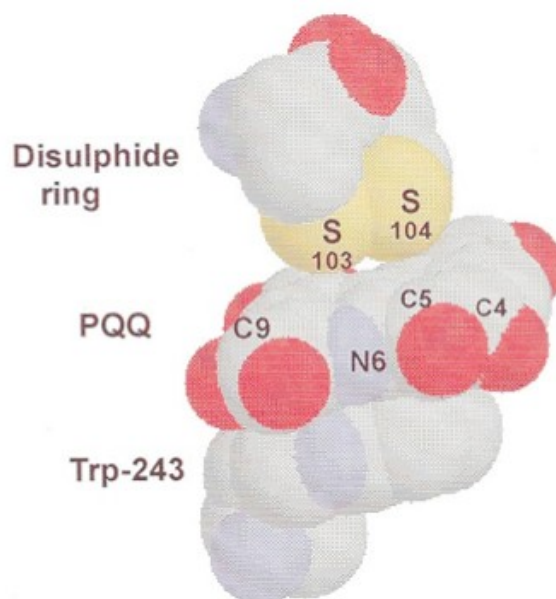


Figura 8 - Anel dissulfeto no sítio ativo da metanol desidrogenase [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003].

A **Figura 10** mostra que o Asp-308 ocupa a mesma posição no modelo da ADH que o Asp-303 ocupa na MDH (**Figura 9**). Isto é importante porque foi sugerido que funciona como uma base no sítio ativo, iniciando a reação com o substrato álcool pela abstração de próton. Este aspartato é conservado na MDH, ADH e nas três GDHs, justificando a observação sobre sua importância no mecanismo [Cozier *et al.*, 1995].

Em adição às interações equatoriais mostradas, a PQQ está comprimida entre o anel indol do Trp-243 e domínio da ligação de dissulfeto como mostrado na **Figura 8** [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003]. Por analogia com o mecanismo proposto para a MDH [Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003], o Asp-308 atua como uma base, iniciando a reação pela abstração de um próton do etanol; neste mecanismo o íon de cálcio atua como um ácido de Lewis, coordenando com o oxigênio carbonil C-5. A diferença mais significativa entre o modelo do sítio ativo de ADH (**Figura 10**) e aquele da MDH (**Figura 9**) é que o Arg-331 no MDH é substituído no ADH por Lis-335 [Cozier *et al.*, 1995].

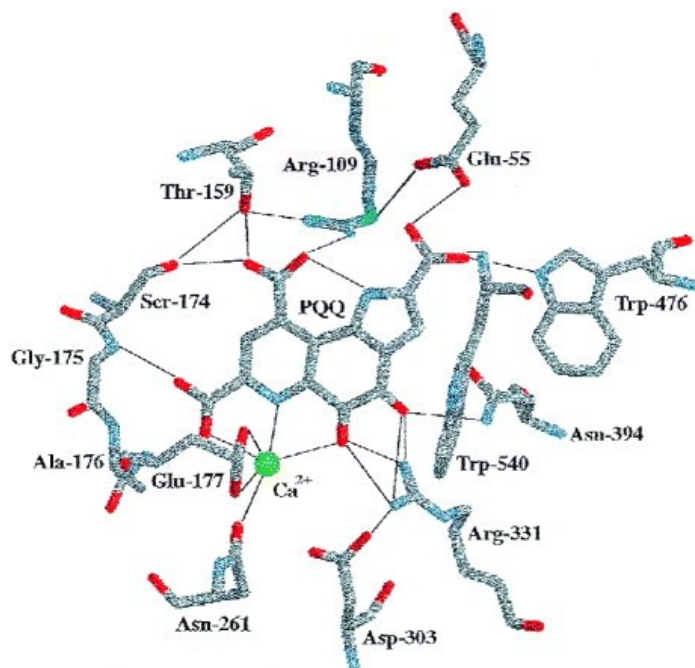


Figura 9 - Cordenação do íon de cálcio e PQQ no sítio tivo da metanol desidrogenase [Cozier e Anthony, 1995; Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams 2003].

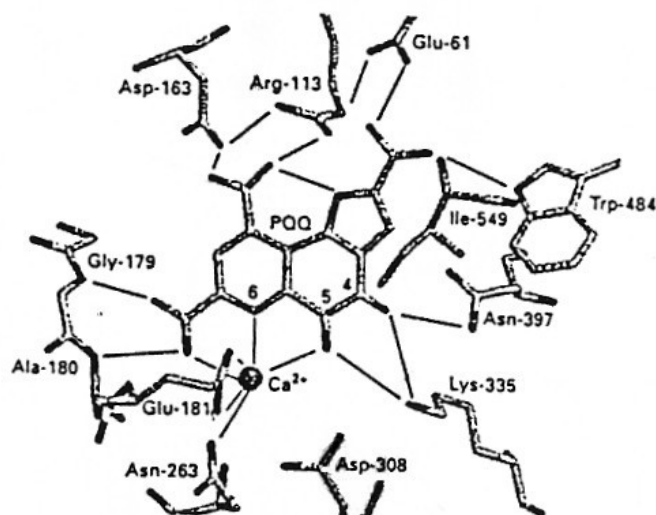


Figura 10 - Cordenação do íon de cálcio e ligação da PQQ no sítio tivo do modelo da álcool desidrogenase [Cozier *et al.*, 1995].

3. Mecanismos de catálise da metanol desidrogenase

A enzima catalisa uma reação ping-pong consistente com redução de PQQ pelo substrato e liberação de produto, seguida por duas transferências seqüenciais de elétron ao citocroma c_L , período em que a PQQH₂ é oxidada de volta à quinona via semiquinona radicalar [Duine e Frank, 1980; Frank *et al.*, 1988; Dijkstra *et al.*, 1989].

A carbonila C-5 da PQQ isolada é muito reativa em relação aos reagentes nucleofílicos, tal como, o metanol, levando à conclusão de que um complexo covalente PQQ-substrato pode ser importante no mecanismo da reação. Isso é consistente com a reação da MDH com ciclopropanol que dá um aduto propanal no C-5 da PQQ, indicando que o mecanismo consiste de abstração de próton por uma base, com ruptura do anel que gera um carbânion, que então ataca o C-5 da PQQ eletrofilicamente [Frank *et al.*, 1989a,b]. Supõe-se que durante a oxidação do metanol, uma abstração de próton similar precisa ocorrer, seguida pela formação de uma ligação carbono-oxigênio para dar um intermediário hemicetálico. É provável que o Asp-303 (**Figura 9**) forneça a base catalítica que inicia a reação, pela abstração de um próton do substrato alcoólico (**Figura 11**). No mecanismo mostrado na **Figura 11** a oxidação produzida pela abstração de próton resulta em, ataque ao C-5 eletrofilicamente, conduzindo à formação do intermediário hemicetálico proposto, a subsequente redução da PQQ, com liberação de aldeído sendo facilitada pela ionização anterior do complexo hemicetálico que pode envolver o átomo N-pirrólico. Um mecanismo alternativo envolveria transferência de hidreto ácido/base-catalisada simples, em que o Asp-303 fornece novamente a base e Ca²⁺ atua simultaneamente como um ácido de Lewis (**Figura 12**). Estudos, usando, análogos de PQQ ligados a Ca²⁺ em solventes orgânicos, forneceram evidências para mecanismos envolvendo formação de hemicetal (**Figura 11**) [Itoh *et al.*, 1997; Anthony e Williams, 2003].

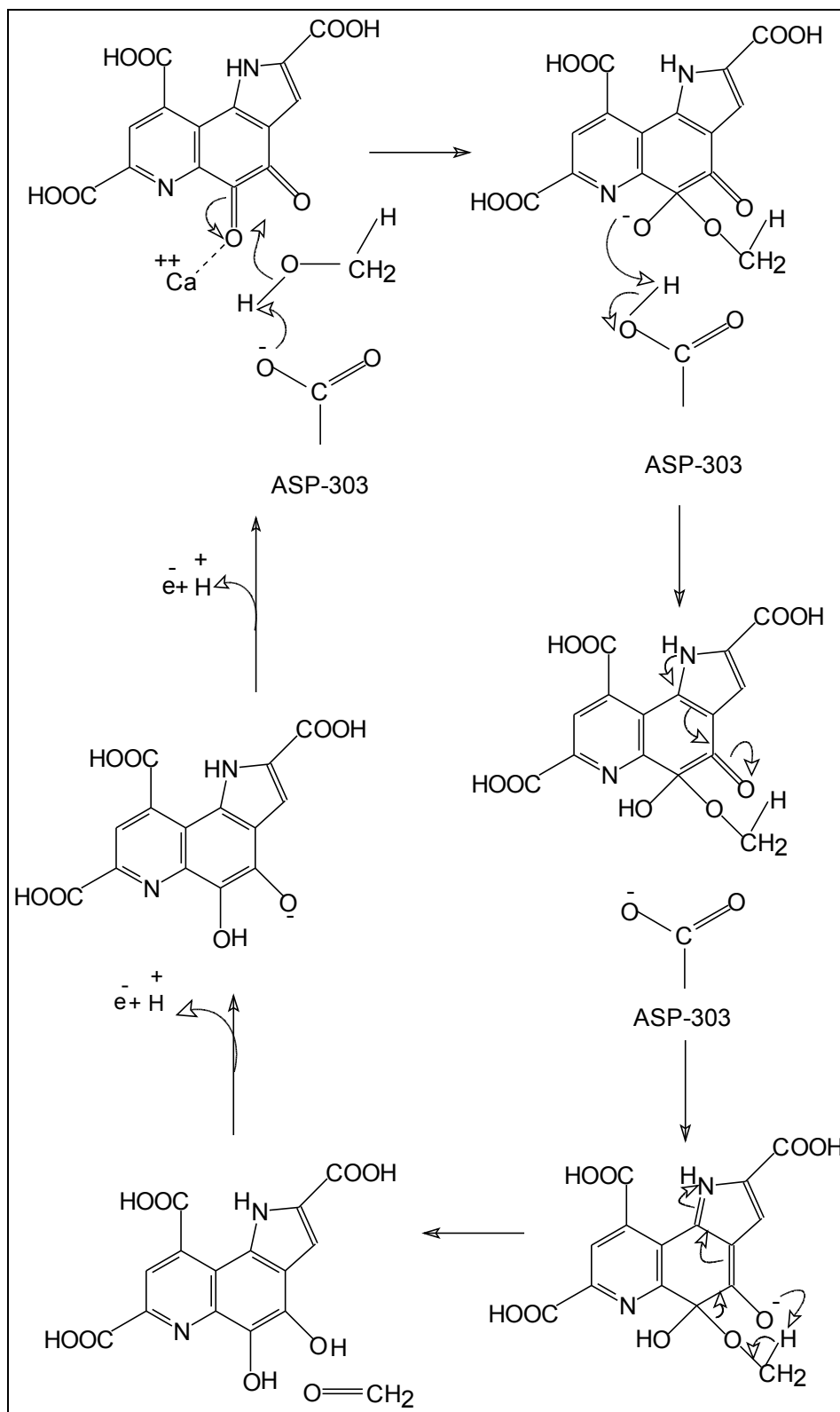


Figura 11 - Mecanismo da metanol desidrogenase envolvendo formação de um intermediário hemicetal [Anthony, 1996; 1997; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003].

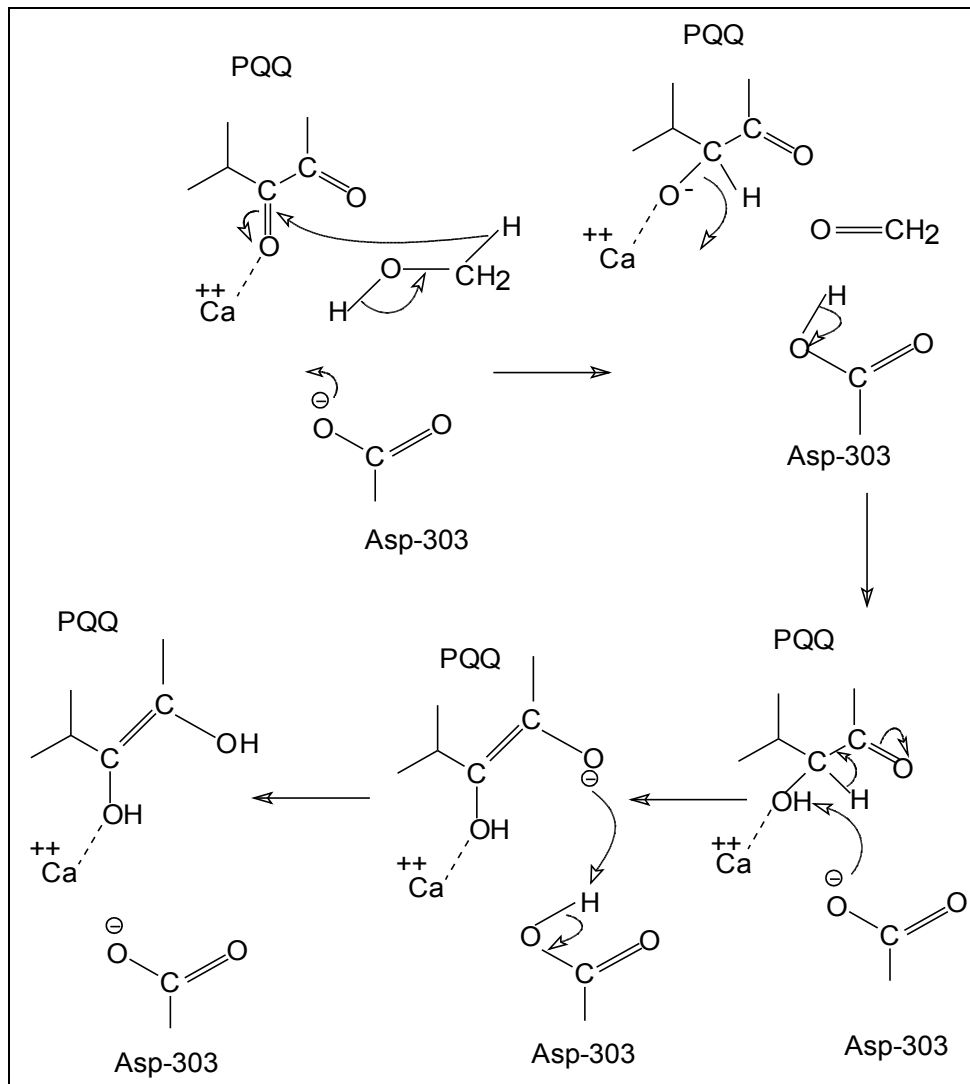


Figura 12 - Um mecanismo de transferência de hidreto alternativo [Anthony, 1996; Anthony e Ghosh, 1998; Anthony e Williams, 2003].

4. Aceptores de elétrons

4.1. Aceptores naturais de elétrons

A ubiquinona é o aceptor natural de elétrons da QH-ADH. Foi constatado que *in vivo* a QH-ADH doa elétrons para a ubiquinona que se encontra na membrana fosfolipídica da bactéria, sendo o ubiquinol resultante subseqüentemente oxidado pela oxidase terminal que gera um gradiente eletroquímico de próton [Frébertova *et al.*, 1998]. A enzima também reage com vários homólogos da ubiquinona e com a ubiquinona nativa em proteolipossomas [Matsushita *et al.*, 1992; 1996]. Na redução da ubiquinona, um elétron do etanol deve ser transferido dentro

do complexo da ADH, onde a PQQ e vários grupamentos heme c podem estar envolvidos na transferência do elétron para a ubiquinona [Matsushita, 1996].

4.2. Aceptores artificiais de elétrons

Durante a oxidação do etanol *in vitro*, as ADHs podem utilizar o metilsulfato de fenazina (PMS), o 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) ou ferricianeto de potássio como aceptores artificiais de elétrons [Matsushita *et al.*, 1996; Matsushita *et al.*, 1999]. Visto que o ferricianeto de potássio reage com os componentes heme que tem um alto potencial redox. Os sítios heme c no complexo ADH devem reduzir o ferricianeto [Matsushita *et al.*, 1996; 1999]. A ADH é também capaz de utilizar ubiquinonas de cadeia curta e ferricianeto de potássio como aceptores artificiais de elétrons [Frébortova *et al.*, 1998]. Além disso, a ADH está envolvida no sistema oxidase insensível a CN (cianetos) da cadeia respiratória da *G. suboxydans* [Matsushita *et al.*, 1991; Matsushita *et al.*, 1996] e pode mediar a transferência de elétron de outra desidrogenase primária como a glicose desidrogenase para o ferricianeto [Matsushita *et al.*, 1996]. Assim, a ADH parece ter várias funções adicionais *in vivo*, além da oxidação do etanol a acetaldeído [Matsushita *et al.*, 1996].

5. Modelos cinéticos

Temos visto como a concentração de substrato afeta a taxa de uma simples reação enzimática com apenas uma molécula de substrato ($S \rightarrow P$). Em muitas reações enzimáticas, no entanto, duas ou mais moléculas de um substrato ou de substratos diferentes ligam-se à enzima e participam da reação. Por exemplo, na reação catalizada pela hexoquinase, ATP e glicose são moléculas de substrato e a ADP e a glicose-6-fosfato são os produtos:

As reações enzimáticas com dois substratos usualmente envolvem a transferência de um átomo ou grupo funcional de um substrato para outro. Tais reações acontecem por meio de um ou vários caminhos diferentes. Em alguns casos, ambos os substratos são ligados à enzima ao mesmo tempo, em algum instante da reação, formando um complexo ternário não-covalente. Esse complexo pode ser formado por substratos ligados em uma seqüência aleatória ordenada. Nenhum complexo ternário é formado se o primeiro substrato é convertido em

produto e dissociado antes que o segundo substrato seja ligado. Um exemplo disso é o mecanismo pingue-pongue ou de dupla troca. A cinética do estado estacionário freqüentemente pode ajudar na distinção entre essas possibilidades [Lehninger *et al.*, 2000]. Há também o mecanismo hexa-uni pingue-pongue, representado na **Figura 13** [Machado *et al.*, 1999].

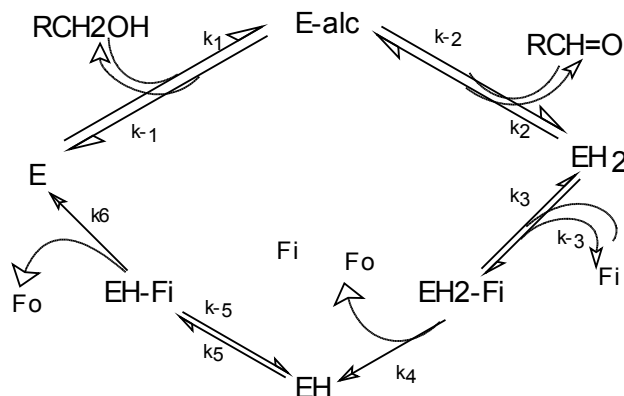


Figura 13 - Cinética hexa-uni ping-pong para oxidação do QH-ADH catalisado de álcool em aldeído por ferricianeto (Machado *et al.*, 1999).

6. Especificidade para substratos

Machado *et al.*, [1999] estudaram a especificidade da QH-ADH tipo II de *A. pasteurianus* LMG 1635 para uma série de álcoois primários (metanol, etanol, 1-propanol, 1-hexanol, 1-octanol) secundários (2-propanol, (*rac*)-2-butanol, (*rac*)-2-hexanol, (*rac*)-2-octanol), além de outros grupos (*rac*)-2,3-epoxi-1-propanol, (*rac*)-1-feniletanol, (*rac*)-1-fenil-1-propanol, (*rac*)-2-fenil-1-propanol, 3-fenil-1-propanol, (*rac*)-1-fenil-2-propanol, (*rac*)-1,2-propanediol, 1,3-propanediol, *trans*-1,2-cicloxanediol e *trans*-1,4-cicloxanediol) com distintos tamanhos de cadeia que mostraram atividades significativas. Os valores das atividades específicas diminuíram à medida que aumentou a cadeia carbônica para os álcoois primários variando de 146 U/mgP para o etanol a 74 U/mgP para o 1-octanol. A especificidade desta enzima para a oxidação do metanol foi baixa (3,6 U/mgP). Para os álcoois secundários as atividades aumentaram com o aumento da cadeia carbônica de 12 U/mgP para o 2-propanol a 43 U/mgP para o (*rac*)-2-octanol, porém menores em relação aos álcoois primários.

Piyawan *et al.*, [2003] analisaram as atividades específicas de duas álcool desidrogenases NAD-dependente (ADHs) e do extrato bruto da cepa mutante *A.*

pasteurianus CN6-2. A ADH-NAD I mostrou uma ampla especificidade para os álcoois primários (C₂ a C₁₀) com maior atividade em etanol (16,4) U/mgP, 1-propanol (14,7 U/mgP) e 1-butanol (13,4 U/mgP); cíclicos como o ciclobutanol (11,9 U/mgP) e álcool benzílico (1,26 U/mgP) e vários aldeídos. O acetaldeído (364 U/mgP) e propionaldeído (223 U/mgP), foram os substratos testados mais adequados para a reação reversa. Por outro lado, a ADH-NAD II mostrou preferência por álcoois secundários (C₃ a C₈) como o *R*-(-)-2-hexanol (184 U/mgP) e 2-hexanol (168 U/mgP). Entre os aldeídos, o melhor substrato testado para reação reversa foi o butiraldeído (888 U/mgP). Os álcoois cíclicos também foram oxidados pela NAD-ADH II, com atividades específicas de 13,2 U/mgP para o ciclohexanol e 8,73 U/mgP para o ciclobutanol.

Várias outras quinoproteínas desidrogenases foram caracterizadas e utilizam uma grande variedade de monossacarídeos, álcoois, aminas e aldeídos como substratos [Davidson, 2004].

7. Enantiosseletividade das álcool desidrogenases das bactérias do ácido acético

Duine *et al.*, [1994] estudaram a enantiosseletividade da quinoproteína álcool desidrogenase. A QH-ADH (II) de *A. pasteurianus* e a QH-ADH (II) de *A. acetii* têm preferência pelo enantiômero (S) do substrato glicidol e a QH-ADH (II) de *G. oxydans* para os isômeros (R) do solketal e (S) do glicidol, enquanto o extrato bruto contendo Q-ADH das bactérias *A. pasteurianus*, *A. acetii* e *G. oxydans* mostrou enantiopreferência para o isômero (S) do substrato glicidol. As QH-ADH isolada de *A. pasteurianus* LMG 1635 mostrou enantiosseletividade para vários álcoois secundários racêmicos como os (+)-2-butanol; (+)-2-hexanol e (+)-2-octanol, tendo preferência pela oxidação do (S)-enantiômero e para o citronelol, sua preferência foi pelo isômero (R) [Machado *et al.* 1999a]; A QH-ADH tipo II nas bactérias *A. pasteurianus* apresentou preferência pelo enantiômero (S) para os substratos glicidol e 2-butanol, na *A. acetii* mostrou preferência (S) para o substrato glicidol e na *G. oxydans*, apresentou preferência pelos enantiômeros (S) para o substrato glicidol e (R) para os substratos solketal e 1,2-ciclohexanediol [Jongejan, *et al.*, 2000]. A enzima estudada por Piyawan *et al.*, [2003] parece ser altamente ativa para os *R*-(-)-estereoisômeros e mostra enantiosseletividade para o isômero (R), com 107, 184 e

138 U/mgP para o *R*-(-)-2-butanol, *R*-(-)-2-hexanol e *R*-(-)-2-octanol, respectivamente, enquanto que para o isômero (*S*) mostrou valores de 18,4 U/mgP para o *S*-(+)-2-butanol, para o *S*-(+)-2-hexanol com 9,95 U/mgP e para o *S*-(+)-2-octanol com 2,3 U/mgP. Em seu trabalho, Molinari *et al.*, [2003] testaram 45 cepas de *Gluconobacter* e *Acetobacter* para a biotransformação de 2-metil-1,3-propanediol proquiral que resultou na melhor ceidata para o futuro desenvolvimento: A *A. pasteurianus* DSM 8937 converteu completamente o substrato em ácido propiônico (*R*)-3-hidróxi-2-metil (**Figura 14**). A síntese monomérica do ácido D-(-)-láctico foi obtida via oxidação enantiosseletiva de 1,2-propanediol racêmico por *G. oxidans* DMS 2003 (**Figura 15**). A bioconversão foi processada com alto excesso enantiomérico (> 99%) [Wu Su *et al.*, 2004]. A oxidação enantiosseletiva de 2-metil-1,3-propediol dando o ácido (*R*)-3-hidróxi-2-metil propiônico foi obtida de cepas de *Gluconobacter* e *Acetobacter*, mas a completa enantiosseletividade não foi alcançada [Molinari *et al.*, 2003]. A biotransformação tem muitas vantagens úteis sobre a síntese química, tais como as quimio-, regio- e enantiosseletividade.

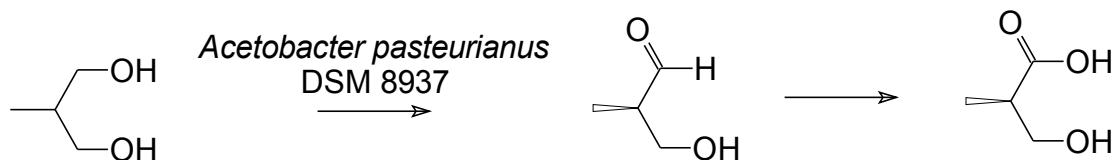


Figura 14 - Oxidação enantiosseletiva do 2-metil-1,3-propanediol proquiral para (*R*)-3-hidroxi-2-metil por *Acetobacter pasteurianus* (Molinari *et al.*, 2003).

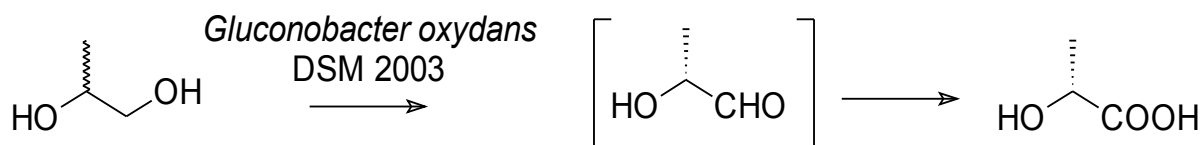


Figura 15 - Oxidação enantiosseletiva do 1,2-propanediol racêmico para D-(-)-ácido láctico por *Gluconobacter oxydans* (Wu Su *et al.*, 2003).

8. Álcool Desidrogenase NAD-independente em Biocatálise

A Biocatálise emprega microrganismos intactos ou suas enzimas isoladas como catalisadores. Nas últimas três décadas tem havido uma grande conscientização da importância da quiralidade para a atividade biológica. As oxirredutases são enzimas com grande potencial de uso em biocatálise para obtenção de novos fármacos e também substâncias de interesse em química fina, visto que são capazes de catalisarem oxidações régio- e estereoseletivas ou reduções de várias substâncias naturais [Fang *et al.*, 1995, McLoughlin e Lowe, 1997].

O uso de catalisadores da naturais – enzimas – para transformação de componentes orgânicos produzidos pelo homem não é totalmente novo, uma vez que já vem sendo utilizado há aproximadamente um século [Faber, 1997]. O que mudou é o objeto de pesquisa. Enquanto os primeiros estudos direcionaram-se à elucidação das rotas bioquímicas e mecanismos das enzimas, o enorme potencial de emprego de enzimas para transformar componentes orgânicos não naturais somente foi percebido no início dos anos 80 (**Figura 16**) [Faber, 1997].

Como resultado desta intensa pesquisa, as enzimas conquistaram um importante lugar na síntese orgânica contemporânea [Roberts, 1993; Faber, 1997]. Isto é refletido pelo fato de que 8% de todos os trabalhos em química orgânica sintética continham elementos de biotransformação em 1991, com previsão de crescimento [Faber, 1997].

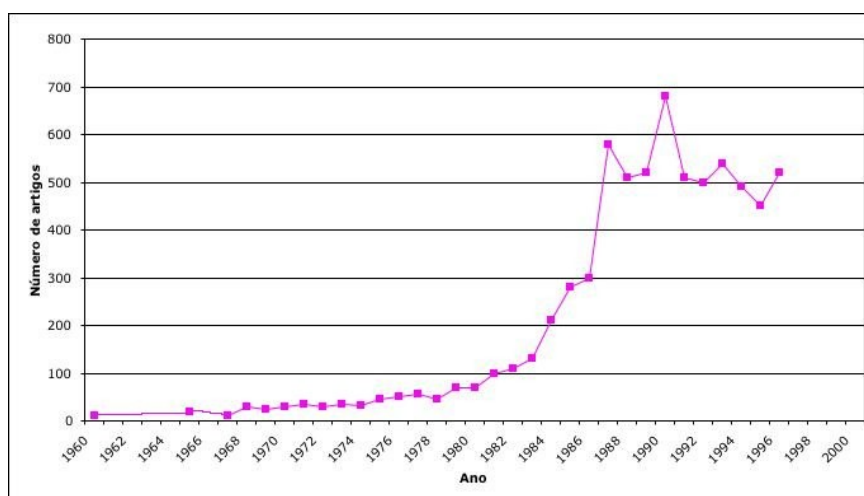


Figura 16 – Publicações anuais sobre as transformações biocatalíticas de compostos orgânicos não naturais [Faber, 1997].

Muito da pesquisa inicial foi retardada pelo dogma tacitamente aceito da bioquímica tradicional, o qual afirmava que enzimas são os catalisadores próprios da natureza desenvolvidos durante a evolução para a regulação das rotas metabólicas. Esta estreita definição implicava que componentes orgânicos produzidos pelo homem não podem ser considerados como substratos. Uma vez que esse problema acadêmico foi atacado pelos não tradicionalistas, demonstrou-se rapidamente que a tolerância de substratos pelas enzimas é muito mais ampla do que se acreditava. Claro que há numerosas enzimas que estão muito estritamente ligadas ao seu substrato natural, elas desempenham um importante papel no metabolismo e geralmente não são aplicáveis para biotransformações. Por outro lado, um impressionante número de biocatalisadores têm mostrado possuir uma ampla tolerância ao substrato por manter suas propriedades catalíticas ótimas no que diz respeito ao quimio-, regio- e, mais importante, enantiosseletividade. Para muitas dessas enzimas, os substratos naturais – se há algum – não são conhecidos. Como conseqüência, a freqüência do uso de uma enzima particular não é nem mesmo distribuída entre os vários tipos de biocatalisadores, mas segue um padrão mostrado na **Figura 17** [Faber, 1997].

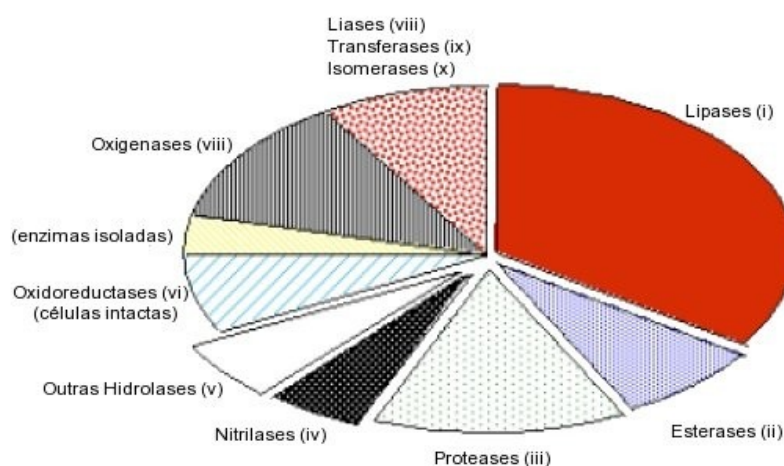


Figura 17 – Freqüência do uso de enzimas em biotransformações [Faber, 1997].

As bactérias dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* há muito são conhecidas por sua capacidade de catalisar a oxidação de vários álcoois nos correspondentes aldeídos e ácidos. Amplas revisões da distribuição e caracterização das enzimas envolvidas nos sistemas de oxidação de açúcar e álcool têm aparecido.

Estudos de *A. pasteurianus* em culturas quemostáticas mostraram que a álcool desidrogenase dependente de NAD(P) expressou-se durante os cultivos em etanol, ácido acético e lactato [De Lay, 1958]. Descobriu-se que a QH-ADH Tipo II, é expressa mais eficientemente em células cultivadas em etanol, e é estritamente responsável pela oxidação do glicidol [Machado, 1999].

9. Importância dos álcoois quirais

Álcoois enantiomericamente puros são intermediários importantes para a síntese de fármacos, agrotóxicos, feromônios, aromatizantes, fragrâncias, cristais líquidos bem como auxiliares quirais na síntese quiral [Elferink *et al.*, 1991; Geerlof, *et al.*, 1994b; Faber, 1998]. Como exemplo, dentre outros, podem ser citados o glicidol (2,3-epoxi-propanol) e o citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) [Elferink *et al.*, 1991; Geerlof, *et al.*, 1994a, 1994b; Keinan *et al.*, 1990; Machado *et al.*, 1995, 1999b]. Os álcoois secundários opticamente ativos são precursores para a preparação de produtos naturais quirais. Assim, o (S)-2-octanol é utilizado como material de partida para a síntese de cristais líquidos ferro-elétricos e o (S)-sulcatol é usado devido a sua atividade biológica de feromônio de atração em insetos da família Scolytidae [Devaux-Basseguy *et al.*, 1997]. A oxidação de álcoois primários com bactérias do ácido acético provou ser um meio fácil e eficiente para a produção de ácidos carboxílicos diversos [Svitel *et al.*, 1995; molinari *et al.*, 1997; Gatfield *et al.*, 1988; Gandolfi *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2002]. Além disso, estas bactérias podem ser empregadas para a oxidação enantioselectiva de diferentes álcoois racêmicos primários para a produção de ácidos carboxílicos opticamente puros [Geerlof *et al.*, 1994; Molinari *et al.*, 1999; Romano *et al.*, 2002]. A enantioselectividade da QH-ADH pertencente às bactérias do ácido acético foram revisadas e vários mecanismos para sua estereopreferência foram propostos [Jongelan *et al.*, 2000]. A oxidação estereosseletiva feita pela *Acetobacter* pode ser uma alternativa para obtenção de pureza enantiomérica desses álcoois. Estudos mostram o envolvimento das desidrogenases primárias, entre elas ADH, no sistema de oxidação do etanol e revelam sua alta estabilidade, vasta especificidade e alta enantioselectividade para álcoois primários, secundários e aromáticos, o que torna bastante promissora sua aplicação em biocatálise [Adlercreutz 1991; Geerlof *et al.*, 1994a; 1994b; Machado *et al.*, 1995; 1999a; 1999b].

As rotas sintéticas para obtenção de substâncias enantiomericamente puras podem utilizar racematos, um 'pol' quiral ou substâncias pro-quirais como material de partida. As técnicas de biocatálise para obtenção de álcoois enantiomericamente puros são divididas em: (a) resolução cinética que consiste na oxidação preferencial de um dos dois enantiômeros de uma mistura racêmica do álcool, (b) redução de uma cetona pro-quiral [Straathof e Jongejan 1997; Faber 1998; Machado 1999; Machado *et al.*, 1999a].

9.1. Mercado Mundial de drogas quirais

O desenvolvimento de drogas enantiomericamente puras é o alvo principal da indústria uma vez que os mensageiros moleculares e os receptores da superfície celular que os químicos medicinais tentam afetar são quirais, o que leva ao desenvolvimento de drogas cujas moléculas tenham assimetria com seu alvo biológico [Stinson, 2000]. Embora em muitos casos a mistura racêmica possa ser usada com um dos isômeros apresentando a atividade requerida e o outro permanecendo inativo, em muitos casos o isômero que não apresenta a atividade requerida pode causar efeitos adversos prejudiciais ao organismo. Para mostrar a importância das drogas quirais atualmente, basta avaliar seu aparecimento entre as drogas mais vendidas. Em 1997, entre as 100 drogas mais vendidas no mundo, 50 correspondiam a enantiômeros únicos, o que representou 42.8 bilhões de dólares (51% dos 85.2 bilhões de dólares das vendas para estas 100 drogas) [Stinson, 1998]. Os enantiômeros únicos são também importantes se avaliarmos as 300 drogas mais vendidas, com vendas de 64.7 bilhões de dólares (em uma mercado total de 124.4 bilhões). O mercado de drogas quirais enantiomericamente puras atingiu 115 bilhões de dólares no mundo em 1999, com estimativas de crescimento da ordem de 8% ao ano, atingindo 146 bilhões em 2003 [Stinson, 2000]. As vendas mundiais de drogas quirais isoméricas puras correspondiam a 21% em 1997, e esta participação aumentou para 32% do mercado mundial (avaliado em 360 bilhões de dólares) em 1999 [Stinson, 2000].

Entre os principais tipos de drogas quirais enantiomericamente puras vendidas, as drogas cardiovasculares representam a categoria mais importante, juntamente com as drogas para o sistema nervoso central, como pode ser visto na **Tabela 6**. O mercado mundial de drogas cardiovasculares correspondia a 13% (20

bilhões) do mercado mundial de drogas quirais enantiomericamente puras em 1997. Este mercado poderia ser maior, entretanto, as drogas bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores de angiotensina II são aquirais. Estas duas classes de substâncias são essenciais para o tratamento da pressão alta, principal doença cardiovascular tratada por meio de medicamentos [Stinson, 1998]. Dentre as drogas quirais cardiovasculares mais importantes estão aquelas responsáveis pela redução da síntese do colesterol, as estatinas, que são inibidoras da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima. Em 1997, estimava-se um mercado mundial 8.4 bilhões de dólares para esta classe de substâncias, sendo que a uma taxa de crescimento de 16% anuais este mercado atingiria 17.6 bilhões de dólares em 2002 [Stinson, 1998].

A quiralidade tem sido também usada para estender a patente de drogas atualmente em uso ou garantir participação de mercado. Um exemplo disto é a droga anti-úlceras Prisolec (omeprazol) produzida pela AstraZeneca, vendida como uma mistura racêmica com mercado mundial de 8 bilhões e cuja patente venceria em 2002. A empresa descobriu que a atividade biológica residia no enantiômero *S*, desenvolveu uma nova formulação e agora comercializa a droga na forma enantiomericamente pura (esomeprazol, nome comercial Nexus), cujo mercado mundial estimado foi de 750 milhões em 2003. Assim, a empresa garantiu a participação no mercado de drogas anti-úlceras por mais alguns anos [Stinson, 2000]. A quiralidade também permitiu aos laboratórios Sepracor uma participação no mercado das drogas anti-depressivas, com a comercialização do enantiômero ativo da droga anti-depressiva Prozac (fluoxetina), da Elly Lilly. Em 1998, a Sepracor patentou o isômero *R* da fluoxetina após a descoberta de que a atividade da mistura residia no mesmo. Isto levou o laboratório a receber, da Elly Lilly, 90 milhões de dólares pela comercialização da droga isomericamente pura.

A previsão de crescimento do mercado mundial de drogas enantiomericamente puras também tem levado muitas indústrias como a Basf, Syntho Chiragenics, Chirex e Onyx a gastar milhões de dólares na construção de unidades de pesquisa e síntese de intermediários e drogas quirais, bem como no licenciamento de tecnologias desenvolvidas em centros acadêmicos de universidades e institutos de pesquisa [Stinson, 2000].

Tabela 6 - Evolução do mercado mundial de drogas quirais (milhões de dólares)
[Stinson, 2000]

Tipo de Droga	Ano				
	1996	1997	1998	1999	2000
Cardiovascular	17.530	20.046	21.906	24.805	26.012
Antibiótico/antifúngico	19.527	20.064	19.756	20.907	23.265
Hormônios/endocrinologia	8.006	8.528	12.297	13.760	17.345
Oncologia	6.803	7.513	8.006	9.420	13.360
Sistema nervoso central	4.065	5.231	7.027	8.592	13.720
Hematologia	5.199	6.033	6.730	8.580	11.445
Antiviral	1.815	5.537	6.131	7.540	13.446
Respiratório	1.201	2.327	4.305	5.087	8.795
Gastrointestinal	-	669	1.718	2.998	5.355
Ofitálmico	675	1.087	1.482	1.794	2.070
Dermatologia	545	843	1.124	1.270	1.540
Imunossupressor	1.475	1.998	-	-	-
Anti- inflamatório/analgésico	895	1.483	842	1.045	1.135
Hiperplasia benígna da próstata	450	626	-	-	-
Vacinas	-	-	568	676	1.100
Outros	3.790	5.934	7.947	8.527	7.425
TOTAL	\$72.900	\$87.919	\$99.389	\$115.001	\$146.013

10. Resolução Cinética

A QH-ADH tipo II, a enzima relevante nas resoluções cinéticas do glicidol racêmico usando células intactas de *A. pasteurianus* e extratos de células livres de baixa atividade específica foi isolada e purificada por Machado *et al.*, [1999]. A *A. pasteurianus* oxida glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) em ácido glicídico (ácido 2,3-epoxi-propiónico) com glicidaldeído (2,3-epoxi-propanol) proposto como sendo o intermediário da conversão. A enzima QH-ADH tipo II responsável pela resolução cinética do glicidol racêmico, é inibida pelo glicidaldeído, [Weel *et al.*, 2001]. Ao considerar a estereoespecificidade da oxidação do glicidol pela *A. pasteurianus*, parece que as enzimas desta bactéria para as duas reações consecutivas têm a mesma estereoespecificidade. O (S)-glicidol é preferivelmente oxidado em (R)-

glicidaldeído pela QH-ADH e esse enantiômero foi também preferivelmente oxidado em ácido glicídico (**Figura 18**) [Machado, 1999; Weel *et al.*, 2001].

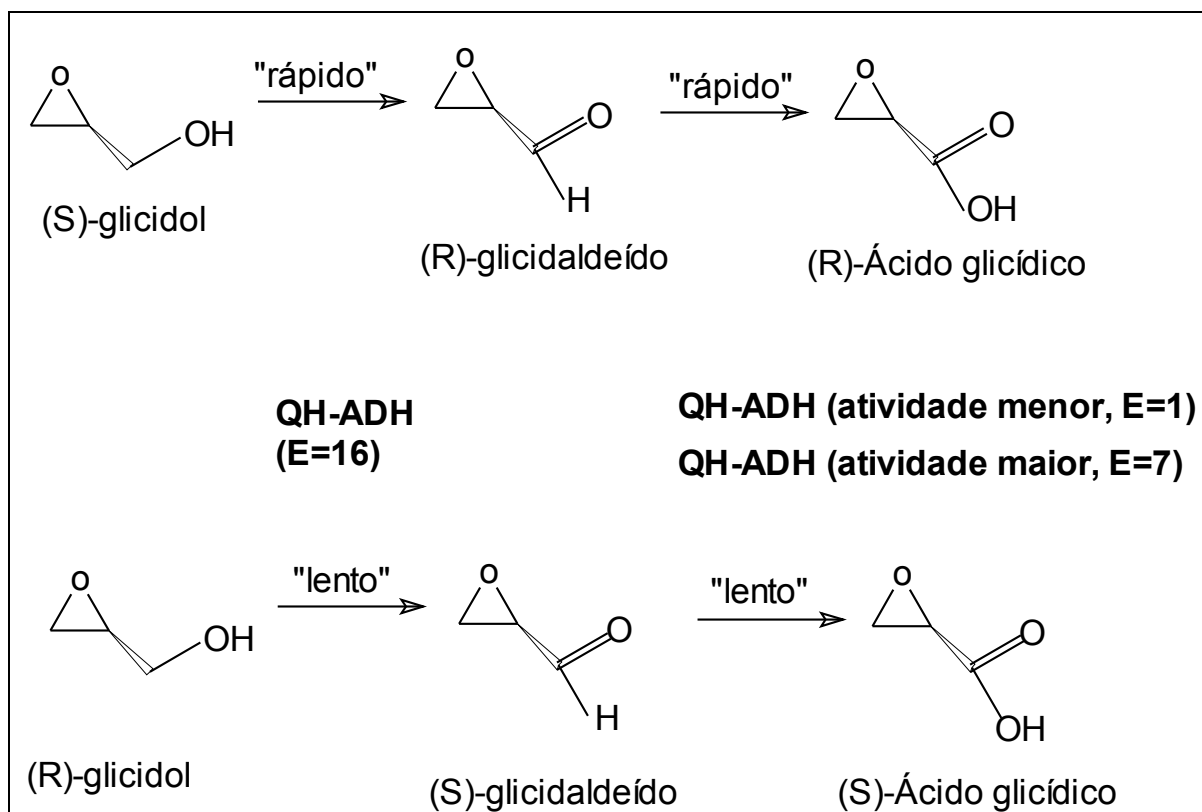


Figura 18 - Preferência da enzima envolvida na resolução cinética do glicidol à ácido glicídico [Machado, 1999; Weel *et al.*, 2001].

A QH-ADH, bem como a ALDH, mostraram uma afinidade maior, mas uma taxa de oxidação máxima menor para o glicidaldeído racêmico. Todavia, a ALDH é a enzima chave na oxidação do intermediário glicidaldeído [Weel *et al.*, 2001].

Geerlof (1994) estudou a viabilidade do uso de álcool oxireductases na produção de químicos finos escolhendo os C3-synthons glicidol, solketal, 2,3-dibromo-1-propanol e 3-bromo-2-metil-1-propanol como substratos (**Figura 19**). Prestou-se atenção também à inexplorada família de quinoproteínas ADHs (que contém PQQ) e suas fontes (bactérias do ácido acético, pseudomonas e metilotrofes), que têm taxas de conversão extremamente altas para álcoois.

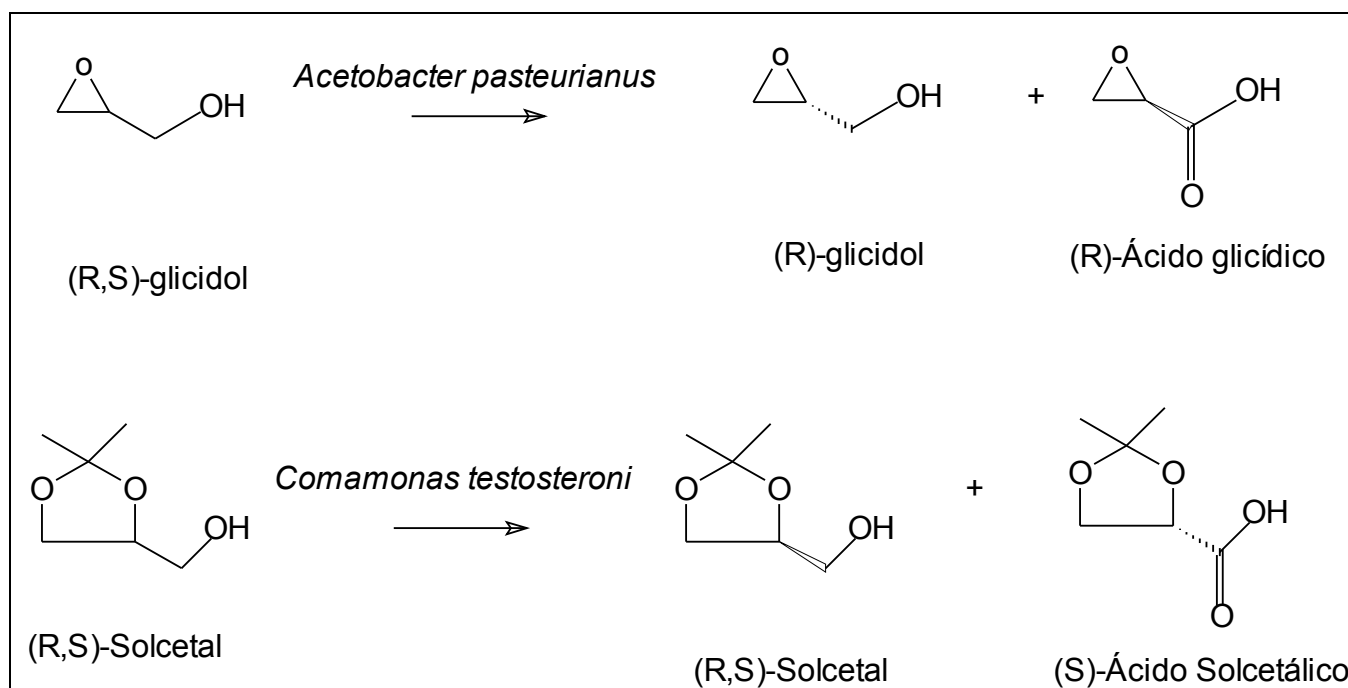


Figura 19 - Estruturas do glicidol e solcetal e dois exemplos de resolução cinética por bactéria [Geerlof *et al.*, 1994].

11. Redução Assimétrica

A redução assimétrica de cetonas é uma das reações mais práticas, fundamentais e importantes para produzir álcoois quirais não-racêmicos que podem ser transformados em várias funcionalidades, sem racemização, para sintetizar químicos industrialmente importantes tais como farmacêuticos, agroquímicos e produtos naturais [Nakamura *et al.*, 2003].

Durante a última década as ADHs secundárias, úteis para a redução assimétrica das cetonas, foram descobertas em vários outros microrganismos. Alguns dos exemplos mais interessantes são *Thermoanaerobium brockii* [Keinan *et al.*, 1986], *Sulfolobus solfataricus* [Trincone *et al.*, 1990] e *Pseudomonas* sp. [Shen *et al.*, 1990]. Outra promissora ADH secundária foi descoberta em *G. oxydans* [Adlercreutz, 1991]. Células de *G. oxydans* permeabilizadas foram usadas para a redução assimétrica de várias cetonas para os (S)-álcoois correspondentes. Este biocatalisador tem várias vantagens, incluindo alta estereosseletividade para muitos substratos e boa estabilidade operacional. O principal problema é que a atividade catalítica das células é baixa, o que faz necessário o uso de grandes quantidades de

células. Além disso, em algumas das reduções, a pureza enantiomérica do produto não é satisfatória. Adlercreutz (1991) utilizou em seus estudos diferentes variedades de bactérias do ácido acético para encontrar as variedades que tinham altos níveis de ADHs secundárias para assim resultar em álcoois com alta pureza enantiomérica.

12. JUSTIFICATIVA

Oxirredutases são enzimas com grande potencial de uso em biocatálise e na área de biossensores para diagnóstico. Em biocatálise vem sendo empregadas para obtenção de novos fármacos e também substâncias de interesse em química fina, visto que são capazes de catalisarem oxidações régio- e estereoseletivas ou reduções de várias substâncias naturais. Apesar de estarem disponíveis comercialmente, as álcool desidrogenases NAD-dependente apresentam algumas desvantagens, principalmente como o alto custo no mercado. Mesmo em escala laboratorial, o preço das coenzimas NAD e NADP são proibitivos para serem usados em quantidades estequiométricas. Como consequência, tem crescido o interesse pela utilização de outras oxirredutases tais como as desidrogenases NAD-independente. Várias desidrogenases NAD-independente ligadas à membrana têm sido isoladas de bactérias Gram-negativas. As Quinohemoproteína ADHs do tipo II têm sido isolada e caracterizada em espécies dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Por mostrar significativa enantiosseletividade para oxidação enantioseletiva de álcoois racêmicos, esta enzima tem despertado interesse para ser empregada na obtenção de álcoois quirais.

Baseando-se nestes dados promissores pretende-se investigar o potencial de oxirredução e a especificidade de cepas termotolerantes de bactérias do ácido acético isoladas das indústrias de vinagre de Alagoas. Tais cepas poderão apresentar algumas vantagens sobre aquelas descritas na literatura visto que são oriundas de flora mista presente nos colmos da cana-de-açúcar utilizados como recheio dos reatores de produção de vinagre e estão adaptadas a processos sem grandes controles de temperatura e pH. As desidrogenases isoladas destas cepas poderão também apresentar termotolerância, e conseqüentemente, ter grande vantagem de poderem se adaptar à condições mais drásticas de temperatura. Pretende-se ainda avaliar a especificidade para álcoois racêmicos da desidrogenase NAD-independente produzida pelas cepas isoladas objetivando o emprego destes

microrganismos, ou uma de suas desidrogenases isoladas, como catalisadores em resolução cinética para produção de álcoois enantiomericamente puros que serão empregados como blocos de construção na síntese de substâncias biologicamente ativas tais como feromônios.

O desenvolvimento de tal tecnologia possibilitará a área de Ecologia Química da UFAL empregar rotas alternativas de síntese para a obtenção de feromônios como o (S)-Rincoforol [S(-)(2E)-6-metil-2-hepten-4-ol].

13. OBJETIVOS

13.1. Objetivo geral

Isolar cepas de bactérias do ácido acético de indústrias regionais de vinagre, avaliar sua termotolerância e seu potencial de oxirredução bem como sua especificidade objetivando viabilizar seu emprego como catalisadores em reações de bioconversão.

13.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar as condições de crescimento que resultem em alta produção de biomassa das cepas isoladas;
- b) Quantificar a atividade de álcool desidrogenase NAD-independente nas biomassas obtidas das distintas condições de cultivo visando identificar a condição de cultivo que produziu biomassa mais ativa;
- c) Obter os parâmetros cinéticos aparentes da desidrogenase NAD-independente presente nos extratos brutos das biomassa objetivando comparar estes parâmetros com os encontrados na literatura para quinhemeproteína álcool desidrogenase de bactérias do ácido acético;
- d) Avaliar a especificidade da desidrogenase NAD-independente presente nos extratos brutos das biomassa para uma série de álcoois primários, secundários e terciários racêmicos objetivando obter dados preliminares sobre seu mecanismo de catálise;

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Assepsia das vidrarias e dos meios de cultivo

Toda vidraria utilizada nos experimentos de cultivo foi esterilizada em autoclave (QUIMIS Aparelhos Científicos Ltda.) durante 30 min., sob pressão de 1 kgf/cm² e temperatura de 120°C, seguido de secagem em estufa de esterilização Mod. FIC.0.5 FAMO (50 a 60°C). Os meios de cultura foram autoclavados por 30 min. sob pressão de 0.5 kgf/cm² e temperatura de 111°C.

2.2. Material Microbiológico

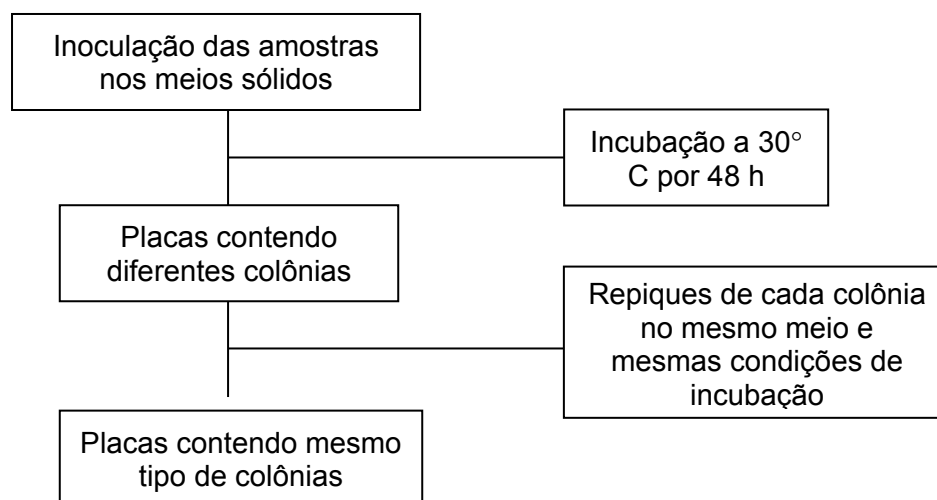
2.2.1. Coleta e isolamento de bactérias do ácido acético

Foram feitas visitas de coleta a indústrias de vinagres, Mari Indústria Comércio de Alimentos Ltda. (Sabor) e Indústria e Comércio Conde Ltda. (Coroa) localizadas na cidade de Maceió-AL, e Indústria e Comércio de Condimento Imperial Ltda., localizada em Estrela de Alagoas-AL. Essas indústrias produzem vinagre a partir do etanol pelo processo alemão, como descrito por Swings, 1992. Esses reatores são constituídos de madeira ou PVC, com bagaço de cana utilizado como recheio.

De cada reator foi retirada amostras do recheio e do vinagre produzido ainda não pasteurizado e durante a amostragem foi medida a temperatura do reator e o pH do vinagre coletado. A manipulação do material biológico foi conduzida em câmara asséptica Mod. CFL, previamente desinfetada com solução de etanol a 70% e lâmpada germicida UV durante 15 min. Os repiques e inoculações efetuados próximos da chama do bico de Bünsen com o auxílio de uma alça de platina flambada e continuamente mergulhada em etanol a 70%.

Foram feitos pequenos cortes (0,5 cm) para obter pequenas amostras do recheio e alíquotas de 3 µL do vinagre não pasteurizado, essas amostras foram inoculadas em duas séries de dez placas de Petri para isolamento de espécies das bactérias do ácido acético. Uma das séries continha meio sólido de Frateur modificado, com etanol como principal fonte de carbono, e a outra série continha meio YGA com glicose como principal fonte de carbono (ver composição, apêndices A.2.1 e A.2.2). As culturas das duas séries de placas foram incubadas em estufa de

cultura Orion Fanem Mod. 502 e mantidas a temperatura de 30°C por 48 h. O crescimento das colônias e sua morfologia foram observadas.



2.2.2. Morfologia dos isolados

Após o crescimento do material microbiológico nos meios de cultura, foram retiradas amostras das bactérias, de forma asséptica com auxílio da alça de platina, e preparados esfregaços em lâminas e posterior coloração de Gram. (ver composição, apêndice A.2.3) As lâminas com o material microbiológico foram analisadas em microscópio binocular (Fab. NICON Mod. ECLIPSE E-200 acoplado a câmera de vídeo).

Os isolados de distintos aspectos (pigmentação, morfologia, etc) foram denominados de LBVE₁, LBVE₂, LBVE₃, LBVE₄ e LBVE₅.

2.2.3. Armazenamento dos isolados

Os isolados foram armazenados sob refrigeração ($\cong 4^{\circ}\text{C}$) em meio (sólido) Manitol com glicidol (ver composição, apêndice A.2.4).

2.2.4. Produção de Biomassa Ativa

Os testes preliminares foram realizados com inoculação direta nos cultivos líquidos, para produção de biomassa. Para cada cultivo líquido, foi retirada uma colônia de cada isolado crescido nas placas. Posteriormente foi introduzida uma etapa de inóculo líquido. Desta forma os experimentos de produção de

biomassa consistiu de duas etapas, uma inicial de inóculo líquido e a outra de produção de biomassa propriamente dita.

2.2.4.1. Inóculo líquido

Tubos de ensaio (15 mL X 2 di) contendo 10 mL de meio líquido contendo como principal fonte de carbono etanol ou ácido acético (ver composição, apêndices A.2.5 e A.2.6) foram inoculados de forma asséptica, com auxílio de alça de platina, com o material bacteriano crescido (24-48 h) em meio (sólido) de Frateur modificado. A seguir, as amostras foram incubadas em agitador orbital (Mod. TE 420 Fab. TECNAL) a 200 rpm por aproximadamente 18 h. Foram testadas três temperaturas de incubação 30, 35 e 37°C para observar sua termotolerância.

2.2.4.2. Otimização das condições para produção de biomassa

Consistiu de um delineamento experimental fatorial variando a concentração de etanol como principal fonte de carbono (10, 15 e 20 g/L) em três distintas temperaturas 30, 35 e 37°C.

Assim, os inóculos líquidos dos isolados LBVE1 e LBVE4 com cerca de 18 h de incubação foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio Frateur modificado (líquido) contendo três concentrações de etanol (10, 15 e 20 g/L) como principal fonte de carbono (ver composição, Apêndice A.2.7). Após incubadas nas mesmas condições de temperatura (30, 35 e 37°C) e agitação acima citada, (cultivos com 10 g/L de etanol por 48 h e com 15 e 20 g/L por 72 h) foi medido o pH das culturas.

Após a otimização dos meios de cultura e condições de incubação para uma maior produção de biomassa, os ensaios passaram a ser conduzidos em triplicata.

2.2.5. Coleta, quantificação e acondicionamento da biomassa

Os cultivos transportados para tubos de ensaio estéreis foram centrifugados (10.000 g) em centrífuga refrigerada Sigma mod. 3K 30 a 4°C durante 10 min, em seguida, o sobrenadante foi descartado e material sedimentado

contendo as células bacterianas foi lavado (5 mL, 2 X) com água destilada estéril esfriada (a aproximadamente 10°C). A massa úmida obtida foi pesada em balança semi-analítica (Mod. AI 200 n° 221090, Fab. Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.) A massa úmida foi transferida para tubos de Eppendorf (1,5 mL) e refrigeradas a $\cong -4^{\circ}\text{C}$ para serem posteriormente utilizadas nos ensaios enzimáticos.

2.3. Quantificação da atividade da Álcool desidrogenase NAD-independente (QH-ADH) na biomassa produzida

2.3.1. Preparo do extrato livre de células

Os ensaios enzimáticos foram realizados imediatamente após a preparação do extrato livre de células.

A biomassa produzida e mantida em banho de gelo foi suspensa em tampão fosfato 10 mM, pH 6,0 (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) (Ver composição, Apêndice A.2.8) na proporção de 1:1 g/mL. Em seguida foi homogeneizada em um homogeneizador de células e, submetida a 6 ciclos em aparelho de ultrassom (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100) por 25 s cada ciclo, com intervalos de 25 s em banho de gelo. Cada amostra foi tratada com 0,1% de triton X. O homogeneizado de células foi então centrifugado a 4°C por 10 min. a 10.000 rpm para obter o extrato livre de células (sobrenanante).

2.3.2. Potencial de oxirredução da biomassa produzida e quantificação da atividade da Álcool desidrogenase NAD-independente (QH-ADH)

O potencial de oxirredução foi avaliado em termos da quantificação das atividades de Álcool desidrogenase NAD-independente.

A atividade enzimática foi conduzida em uma mistura reacional de 1 ml, contendo: 20 mM de etanol, 1 mM de ferricianeto de potássio, 1 mM de NaCN, 0,5 ml de tampão Mc.Ivaine pH 4,0 (Ver composição, Apêndice A.2.9) e extrato livre de células. A taxa de consumo do ferricianeto é monitorada avaliando a absorvência em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2) a 420 nm, e condições de temperatura ambiente. Uma unidade de atividade (U) de álcool desidrogenase NAD-independente foi definida como a quantidade de enzima que em 1 min catalisa a conversão de 1 μmol de álcool (2 μmoles de ferricianeto) sob as condições do

ensaio ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) (Machado *et al.*, 1999b). A atividade enzimática foi calculada através da fórmula representada abaixo e expressa em $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ ou U/mL : onde V é o volume total da mistura reacional, $\Delta A/\text{min}$ é a variação da absorvância por minuto (velocidade da reação), ϵ é o coeficiente de absorção do ferricianeto de potássio ($\epsilon = 1020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c é a distância percorrida pela luz incidente ou caminho ótico (1 cm) e ve é o volume do extrato enzimático.

$$U/\text{mL} = \frac{V \cdot \Delta A/\text{min}}{\epsilon \cdot c \cdot ve}$$

2.3.2.1. Avaliação do perfil especificidade da NAD-independente desidrogenase nos extratos livres de células

O perfil de especificidade da álcool desidrogenase NAD-independente presente nos extratos brutos de células LBVE1 e LBVE4, cultivadas em meio contendo 20 g/L de etanol a 30°C, foi analisada sobre álcoois racêmicos e aldeídos nas concentrações de 10 e 20 mM; conforme metodologia descrita no ítem 2.3.2. Os álcoois primários e secundários racêmicos utilizados nos experimentos foram os seguintes: Etanol, 2-Propanol, (*rac*)2-Butanol adquiridos da Vetec; 2-Metil-2-propanol, 1-Pentanol, 1-Hexanol, *trans*-Hex-2-en-1-ol, 3-Metil-1-butanol (isoamil) e Fenilmetanol (benzil) adquiridos da Aldrich Chemical Company Inc.; 2-Metil-3-butanol adquirido da Merck; (*rac*)2-Metil-4-heptanol, (*rac*)6-Metil-hept-2-en-4-ol (Rinconforol), (*rac*)2-Metil-4-octanol e (*rac*)4-Metil-5-nonanol cedidos pelo Laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais (DQ/UFAL), os aldeídos consistira de Acetaldeído, adquirido da Riedel-de Haën, *p*-Anisaldeído e Decilaldeído adquiridos da Aldrich Chemical Company Inc.

A atividade específica foi determinada em termos de unidades de atividade enzimática (conforme definida no ítem 2.3.2) presentes por mg/mL de proteína (U/mgP), presente na amostra.

2.4. Quantificação das proteínas totais presentes nos extratos livre de células

A concentração de proteína presente nos extratos brutos foi quantificada segundo método de Lowry [Dawson *et al.*, 1939]. Portanto, o reagente de biureto foi preparado misturando-se uma solução de 0,5% de sulfato de cobre pentaidratado

(0,5 mL), uma solução de 1% de tartarato de sódio e potássio (0,5 mL) e uma solução de 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio de 0,1 M (50 mL, Apêndice A.2.10). Adicionou-se o extrato de células livres (enzimático) (200 uL) ao reagente de biureto (1 mL), misturou-se bem durante 2 a 5s, com auxílio de um agitador de tubos (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda.). A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 10 min, adicionando-se em seguida o reagente de Folin-Ciocalteau (200 uL). Após agitação em vortex por 2 a 5 s, a solução foi deixada novamente em repouso durante 20 min., à temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a leitura espectrofométrica da absorvância a 725 nm. O conteúdo protéico do extrato foi expresso em mg/mL. A curva de calibração de proteínas totais foi construída empregando-se albumina de soro bovino como padrão, nas concentrações de 60 a 620 µg/mL em tampão. A leitura das absorvâncias foi realizada sob as condições descritas acima e a curva foi construída utilizando-se as coordenadas absorvância versus concentração.

2.5. Determinação da cinética aparente dos extratos brutos de células de isolados do gênero *Acetobacter* ao substrato etanol

Foram utilizadas concentrações crescentes de etanol e quantificada a atividade enzimática de um volume fixo de extrato bruto para cada uma destas concentrações. As atividades foram quantificadas conforme descrito em 2.3.2. Os valores de atividades obtidos foram plotados no Origin 7.0 (Microcal Ltda, USA) cujas coordenadas foram velocidade de reação versus concentração de etanol (0,5 a 20 mM), empregando a equação $y=a0*x(a1+x)$ correspondente a equação $v=Vmax*S/(km+S)$ do modelo simples de Michaelis-Menten.