

Líquidos iónicos como uma ferramenta para aumentar a eficiência de enzimas

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre

Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Marita Alves Cardoso



Orientador: Doutor José Manuel da Silva Simões Esperança

Co-orientadora: Professora Verónica Cortés de Zea Bermudez

Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2013

Aos meus avós

Maria e António,

de quem tenho tantas saudades.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores Doutor José Manuel da Silva Simões Esperança e Professora Verónica Cortés de Zea Bermudez, sem os quais este trabalho não seria possível. Gostaria de agradecer ao Doutor José Manuel da Silva Simões Esperança por me ter aceite como sua aluna e me ter dado a oportunidade de fazer parte de uma equipa de investigação tão activa e dinâmica como a que possuí no ITQB. Aprendi muito ao longo dos 9 meses em que lá estive sobre investigação científica e trabalho em equipa, mas acima de tudo sobre disciplina de trabalho. Obrigado pela simpatia, generosidade e disponibilidade e pelas conversas construtivas que me ajudaram a ver as coisas de um outro ponto de vista e a progredir. Gostaria de agradecer à Professora Verónica Cortés de Zea Bermudez por mais uma vez me ter aceite como sua aluna, com quem eu me iniciei na investigação e que me tem acompanhado e apoiado ao longo de 4 anos. Tem sido um privilégio ter como orientadora (em trabalhos anteriores), co-orientadora e professora alguém com um conhecimento científico profundo e acima de tudo com uma natureza humana tão gentil, generosa e carinhosa, que sempre me encorajou a fazer mais e melhor.

Gostaria de agradecer ao Professor Luís Paulo Rebelo, responsável pelo grupo e pelo Laboratório de Termodinâmica Molecular, no qual eu trabalhei durante o tempo que estive no ITQB e ao Doutor José N. Canongia Lopes pelas discussões científicas.

Um muito obrigado à Doutora Patrícia Reis e ao estudante de Doutoramento Mário Soromenho do ITQB e à Professora Ana Rodríguez e ao Doutor Francisco Deive da Universidade de Vigo pela síntese e fornecimento dos líquidos iónicos sintetizados em laboratório utilizados neste trabalho.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos e colegas do ITQB e do departamento de Química da UTAD, por estarem sempre prontos a ajudar de uma forma espontânea e voluntária em especial à estudante de Doutoramento Diana Ruivo pela ajuda no trabalho no ITQB em especial com a Fluorimetria Diferencial de Varrimento (DSF) e à Doutora Mariana Fernandes que, com a ajuda e conhecimentos que me transmitiu em trabalhos anteriores, fez com que este trabalho se tornasse mais fácil.

Por último, gostaria de agradecer à minha família que sempre me apoiou ao longo do meu percurso académico. Aos meus pais, por sempre terem feito de tudo para me ajudarem no que lhes foi e é possível e me terem colocado a mim e ao meu irmão como prioridade em tudo ao longo das suas vidas. Ao meu irmão Humberto, pelo apoio incondicional e por me mostrar que é sempre possível ultrapassar as dificuldades. Aos meus avós, que mesmo já não estando comigo me mostraram um amor incondicional e como este é o pilar de uma família.

Marita Alves Cardoso

Resumo

A Química sustentável é uma das áreas científicas que maior relevo tem tido nos últimos anos. A constante procura por processos alternativos baseados em tecnologias “limpas” estende-se a todas as áreas da química, desde a química de síntese até à biocatálise enzimática.

A tese envolveu a aprendizagem de técnicas de síntese e purificação de líquidos iónicos, pois para além de líquidos iónicos disponíveis comercialmente também foram utilizadas líquidos iónicos específicos a que poucos grupos de investigação têm acesso.

Foram implementados dois métodos distintos para medir a actividade catalítica da α -amilase. No primeiro método utilizado, DNS, verificou-se que alguns dos aniões utilizados interferiam com os reagentes de coloração, adulterando os resultados obtidos. Assim, optimizou-se um segundo método baseado na medição do complexo amido-iodo que se revelou mais abrangente e fidedigno. Os resultados do DSF permitem avaliar a estabilidade estrutural da enzima. A análise conjunta dos resultados de estabilidade e de actividade catalítica da enzima permitem obter informação relevante sobre os melhores líquidos iónicos a utilizar.

Foram realizados vários estudos utilizando sistemas aquosos bifásicos como ferramenta para a extração de α -amilase, contudo a interferência dos sais inorgânicos com os métodos de medida da actividade catalítica em cada uma das fases formadas não permitiu uma avaliação definitiva dos melhores sistemas a utilizar, pelo que novos estudos complementares são necessários, possivelmente com a optimização de um terceiro método de quantificação de actividade catalítica. Os estudos realizados por FTIR para identificar interacções entre a enzima e os líquidos iónicos foi realizado muito perto do final deste trabalho e os resultados obtidos mostram que o método utilizado ainda necessita de ser trabalhado em pormenor utilizando distintas condições experimentais.

Abstract

Sustainable chemistry is one of the more relevant scientific areas over the last few years. The continuous search for alternative processes based on clean technologies spreads all over areas of chemistry from synthetic chemistry to enzymatic biocatalysis.

This thesis included the synthesis and purification of ionic liquids, since some specifically designed ionic liquids were used complementary to the ones commercially available.

Two distinct methods for measuring the α -amilase catalytic activity were implemented. In the first method, a DNS assay, it was verified the interference of some ionic liquid anions with the colour reagents, which adulterated the obtained results. Then, a new method based on the formation of the starch-iodine complex was optimized and revealed a broader application than the former one.

The DSF results were used to evaluate the structural stability of the enzyme. The analysis of both stability and activity levels of the enzyme enabled us to obtain relevant information on the best ionic liquids for this process.

Several tests were performed using aqueous biphasic systems as a tool to extract α -amilase. However, the interference of the inorganic salts in the methods used to evaluate the catalytic activity didn't allow to make a final conclusion of the best systems and further complimentary studies are needed, possibly the optimization of a third method to quantify the enzyme's catalytic activity.

The FTIR studies performed to identify the interactions between enzyme and IL were conducted very close to the end of the workplan and the experimental results show that the used method has to be optimized using distinct experimental conditions.

Índice geral

| | |
|---|-------------|
| Lista de Abreviaturas..... | vii |
| Índice de Figuras | x |
| Índice de Tabelas..... | xii |
| Lista de Líquidos Iónicos..... | xiii |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Proteínas..... | 2 |
| 1.1.1. Estrutura das proteínas | 2 |
| 1.1.2. Enzimas | 4 |
| 1.1.3. Estrutura e estabilidade das enzimas..... | 4 |
| 1.1.4. Factores que influenciam a actividade enzimática..... | 5 |
| 1.1.5. Cinética enzimática | 6 |
| 1.1.6. α -amilase | 6 |
| 1.1.7. Aplicações da α -amilase..... | 7 |
| 1.2. Líquidos iónicos..... | 8 |
| 1.2.1. Aplicações do ILs..... | 8 |
| 1.2.2. ILs e a α -amilase | 9 |
| 2. Objectivos..... | 11 |
| 3. Materiais e Métodos | 13 |
| 3.1. Materiais | 13 |
| 3.2. Métodos | 15 |
| 3.2.1. Preparação da solução de enzima..... | 15 |
| 3.2.2. Determinação da curva de calibração para quantificação de proteínas em solução (método de Bradford)..... | 16 |
| 3.2.3. Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)..... | 17 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.2.4. | Método do complexo amido-iodo | 18 |
| 3.2.5. | FT-IR (Infravermelho por Transformada de Fourier) | 19 |
| 3.2.6. | Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF) | 20 |
| 3.2.7. | Sistema Bifásico Aquoso (ABS) | 21 |
| 4. | Resultados e Discussão..... | 22 |
| 4.1. | Capítulo 1:Actividade enzimática..... | 22 |
| 4.1.1. | DNS | 22 |
| 4.1.2. | Complexo amido-iodo..... | 31 |
| 4.2. | Capítulo 2: Estrutura e estabilidade enzimática | 41 |
| 4.2.1. | FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier) | 41 |
| 4.2.2. | Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF) | 46 |
| 4.3. | Capítulo 3: Extracção de enzimas..... | 49 |
| 4.3.1. | Sistema bifásico aquoso (ABS)..... | 49 |
| 5. | Considerações finais..... | 51 |
| 5.1. | Resumo | 51 |
| 5.2. | Conclusões..... | 55 |
| 6. | Bibliografia | 56 |
| | Referências Bibliográficas | 56 |

Lista de Abreviaturas

A - amostra

ABS – Sistema Bifásico Aquoso

Abs – Absorvância

B0 – branco zero

BB – branco

BE – branco de enzima

BIL – branco de líquido iônico

Ca²⁺ - íon de cálcio

CaCl₂ - cloreto de cálcio

cm - centímetro

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

DSF – Fluorimetria Diferencial de Varrimento

FT-IR – Infravermelho por Transformada de Fourier

g – grama

HCL – ácido clorídrico

I₂ - iodo

IL – líquido iônico

ILs – líquidos iônicos

K_{cat} - número de renovação

KCl – cloreto de potássio

KI – iodeto de potássio

K_m - constante de Michaelis

K_3PO_4 - fosfato de potássio tribásico

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar

M – molar

NaCl - cloreto de sódio

Na_2SO_4 - sulfato de sódio

Na_2CO_3 - carbonato de sódio

$(NH_4)_2SO_4$ - sulfato de amónio

nm – nanómetro

nM - nanomolar

pH – logaritmo negativo de $[H^+]$

p/v - peso/volume

t – tempo

T_m - temperatura do ponto médio de desnaturação térmica

u.a. – unidades de absorvância

$V_{m\acute{a}x}$ – Velocidade máxima

V_0 – Velocidade inicial

% - percentagem

α - alfa

β – beta

ΔT_m – diferença entre o T_m da enzima em solução aquosa e em solução de IL

μL - microlitros

μM - micromolar

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

[S] - concentração de substrato

2D – bidimensional

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1.</i> Sistema de vácuo para secagem dos líquidos iônicos. | 14 |
| <i>Figura 2.</i> Determinação da concentração óptima de α -amilase com base na absorvância em função do tempo para o método de DNS. | 22 |
| <i>Figura 3.</i> Gradação da cor pelo método DNS a) negativo, b) c) positivo. | 24 |
| <i>Figura 4.</i> Ensaio de DNS com resultado negativo. | 25 |
| <i>Figura 5.</i> Ensaio de DNS com resultado positivo. | 25 |
| <i>Figura 6.</i> Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião cloreto. | 26 |
| <i>Figura 7.</i> Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião sulfonato. | 27 |
| <i>Figura 8.</i> Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião acetato. | 28 |
| <i>Figura 9.</i> Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião aminoácido. | 29 |
| <i>Figura 10.</i> Resultados pelo método do DNS de outros ILs. | 30 |
| <i>Figura 11.</i> Determinação da concentração óptima de α -amilase com base na absorvância em função do tempo para o método de complexo amido-iodo. | 31 |
| <i>Figura 12.</i> Gradação da cor pelo método do complexo amido-iodo, a) negativo, b) e c) positivo. | 33 |
| <i>Figura 13.</i> Ensaio do complexo amido-iodo com resultado negativo. | 34 |
| <i>Figura 14.</i> Ensaio do complexo amido-iodo com resultado positivo. | 34 |
| <i>Figura 15.</i> Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs dos com anião cloreto. | 35 |
| <i>Figura 16.</i> Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião sulfonato. | 36 |
| <i>Figura 17.</i> Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião acetatos. | 37 |
| <i>Figura 18.</i> Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião aminoácido. | 38 |
| <i>Figura 19.</i> Resultados pelo método do complexo amido-iodo de outros ILs. | 39 |
| <i>Figura 20.</i> Espectros de FTIR do IL $C_2C_1MIMOTf$ com a enzima. | 41 |
| <i>Figura 21.</i> Ampliação dos espectros de FTIR do IL $C_2C_1MIMOTf$ com a enzima na zona onde se encontram as bandas a analisar da estrutura secundária. | 42 |
| <i>Figura 22.</i> Espectros do IL- $C_2MIMC_1SO_4$ de 1000-1600 cm^{-1} | 43 |
| <i>Figura 23.</i> Espectros do IL- $C_2MIMC_1SO_4$ na zona da amida I. | 43 |
| <i>Figura 24.</i> Espectros do IL- $C_2MIMC_1SO_4$ de 1700-3000 cm^{-1} | 44 |
| <i>Figura 25.</i> Placa de ensaio do DSF. | 46 |

Figura 26. Efeito dos ILs na estabilidade da α -amilase (T_m). ΔT_m corresponde à diferença entre o T_m da enzima em solução aquosa e em solução de IL. 47

Figura 27. ABS do ChCl com a enzima e com o K3PO4..... 50

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| <i>Tabela 1.</i> Lista de líquidos iônicos utilizados para o método de DNS. | 23 |
| <i>Tabela 2.</i> Lista de ILs que reagem com o ácido 3,5-dinitrosalicílico. | 30 |
| <i>Tabela 3.</i> Lista de líquidos iônicos utilizados pelo método do complexo amido-iodo. | 32 |
| <i>Tabela 4.</i> Lista de líquidos iônicos utilizados no DSF. | 47 |
| <i>Tabela 5.</i> Comparação dos resultados de DNS e do Complexo amido-iodo (em percentagem aproximadas). | 51 |
| <i>Tabela 6.</i> Resultados do DSF (em valores aproximados). | 53 |

Lista de Líquidos Iónicos

C₂MIMCl - 1-Ethyl-3-methylimidazolium chloride, >98%, io-li-tec, (IL-0093-HP).

C₄MIMCl - 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride, 99%, io-li-tec, (IL-0014-HP).

C₆MIMCl - 1-Hexyl-3-methylimidazolium chloride, >98%, io-li-tec, (IL-0054-HP).

C₈MIMCl - 1-Methyl-3-octylimidazolium chloride, >98%, io-li-tec, (IL-0072-HP).

C₁₀MIMCl - 1-Decyl-3-methylimidazolium chloride, >98%, io-li-tec, (IL-0065-HP).

ChCl – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium chloride, ≥98%, Sigma, 67-48-1.

Benzyl MIMCl – 1-Benzyl-3-methylimidazolium chloride, 99%,io-li-tec,(IL-0140-HP).

(C₂OH)MIMCl - 1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazolium chloride, 99%, oi-li-tec, (IL-0039-HP).

ChH₂PO₄ – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium dihydrogen phosphate, >98%, io-li-tec, (IL-0042-HP).

C₂MIM(C₁)₂PO₄ - 1-Ethyl-3-methylimidazolium dimethylphosphate, 98%, io-li-tec, (IL-0220-HP).

C₂MIM(C₂)₂PO₄ - 1-Ethyl-3-methylimidazolium diethylphosphate, 98%, io-li-tec, (IL-0052-HP).

C₂MIMC₁SO₄ -1-Ethyl-3-methylimidazolium methylsulfate, 99%, io-li-tec, (IL-0112-HP).

C₂MIMC₈SO₄ - 1-Ethyl-3-methylimidazolium octylsulfate, 99%, Merk, 4.90205.

C₂MIMHSO₄ - 1-Ethyl-3-methylimidazolium hydrogensulfate, 99%, io-li-tec, (IL-0091-HP).

(C₂OH)MIMBF₄ – 1-(2-Hydroxyethyl)-3-methyl-imidazolium tetrafluorborate, 98%, Bayer, 30.9.2009.

C₄MIMBF₄ - 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 99%, Solvent Innovation, 174501-65-6.

C₂C₁MIMBF₄ - 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate, 98%, io-li-tec, (IL-0001-HP).

C₄C₁MIMBF₄ - 1-Butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate, 99%, io-li-tec, (IL-0058-HP).

C₂MIMLact – 1-Ethyl-3-methylimidazolium L-(+)-lactate (assay≥96%), Aldrich, 878132-19-5.

C₂MIMOTf - 1-Ethyl-3-methylimidazolium triflate, 99%, io-li-tec, (IL-0009-HP).

C₂C₁MIMOTf - 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazolium triflate, 99%, io-li-tec, (IL-0002-HP).

C₄C₁MIMOTf - 1-Butyl-2,3-dimethylimidazolium triflate, 99%, io-li-tec, (IL-0059-HP).

C₂C₁MIMBr - 1-Ethyl-2,3-dimethylimidazolium Bromide, 99%, io-li-tec, (IL-0135-HP).

C₄MIMBr - 1-Butyl-2-methylimidazolium Bromide, 97%, io-li-tec, (CS-0458-HP).

C₂PyridiniumBr - 1-Ethylpyridinium bromide, 99%, io-li-tec, (IL-0171-HP).

C₂MIM[N(CN)₂] - 1-Ethyl-3-methylimidazolium dicyanamide, 98%, io-li-tec, (IL-0003-HP).

C₄MIM[N(CN)₂] - 1-Butyl-3-methylimidazolium dicyanamide, 98%, io-li-tec, (IL-0010-HP).

C₂MIMOAc - 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate, >95%, io-li-tec, (IL-0189-HP).

ChC₁SO₃ – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium methylsulfonate, >99%, Sintetizado no laboratório.

C₂ChC₁SO₃ – N-ethyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium methylsulfonate, >99%, Sintetizado no laboratório.

C₃ChC₁SO₃ – N-propyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium methylsulfonate, >99%, Sintetizado no laboratório.

C₄ChC₁SO₃ – N-butyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium methylsulfonate, >99%, Sintetizado no laboratório.

C₅ChC₁SO₃ – N-pentyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium methylsulfonate, >99%, Sintetizado no laboratório.

ChC₂SO₃ – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium ethylsulfonate, >99%, Sintetizado em laboratório.

ChOAc – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium acetate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₂ChOAc – N-ethyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium acetate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₃ChOAc – N-propyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium acetate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₄ChOAc – N-butyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium acetate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₅ChOAc – N-pentyl-N,N-dimethyl-hydroxyethylammonium acetate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₂MIMC₁SO₃ – 1-Ethyl-3-methylimidazolium methylsulfonate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₂MIMC₂SO₃ – 1-Ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfonate, >99%, Sintetizado em laboratório.

C₂MIMC₄SO₃ – 1-Ethyl-3-methylimidazolium butylsulfonate, >99%, Sintetizado em laboratório.

ChAla – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium alaninate, >99%, Sintetizado em laboratório.

ChGli – N,N,N-trimethyl-hydroxyethylammonium glicinate, >99%, Sintetizado em laboratório.

1. Introdução

Desde sempre que o Homem procura utilizar os recursos da natureza a seu favor. Já na Antiguidade o Homem recorria a microrganismos para a produção de alimentos. Hoje sabe-se que a produção de alguns alimentos se deve essencialmente às enzimas que estão presentes nesses microrganismos. Assim, para podermos utilizar apropriadamente as enzimas é necessário fazer estudos a fim de termos uma melhor noção de como uma determinada enzima actua e de como maximizar a sua actividade. A Biotecnologia é uma das áreas mais promissoras e prevê-se que em 2025, o mercado de produtos na União Europeia que estarão relacionados com a Biotecnologia seja de 250 Biliões de euros. (Ribeiro , Silva, & Oliveira, 2005)

A Química sustentável é uma das áreas científicas que maior relevo tem tido nos últimos anos. A constante procura por processos alternativos baseados em tecnologias “limpas” estende-se a todas as áreas da química, desde a química de síntese até à biocatálise enzimática.

Foi já no novo milénio que a investigação envolvendo líquidos iónicos teve um crescimento extraordinário devido a algumas características que fazem deles possíveis solventes de excepção, nomeadamente não inflamabilidade, volatilidade negligenciável e elevada estabilidade térmica. Para além disso, a possibilidade de se desenhar o líquido iónico, por alteração do catião e/ou anião, de modo a obter as propriedades e características estruturais desejadas tornou ainda mais relevante esta área de estudo.

No âmbito deste trabalho, escolhemos as amílases pois representam um dos mais importantes grupos de enzimas na biotecnologia, nomeadamente na indústria alimentar. Assim, o objectivo primordial deste estudo foi obter resultados experimentais que nos permitissem avaliar o efeito dos líquidos iónicos na actividade catalítica, estrutura e extracção da α -amílase em estudo. A obtenção destes resultados é fundamental para o desenho de novas

arquitecturas de líquidos iónicos que permitam maximizar a actividade catalítica destas enzimas, bem como permitir processos extractivos mais eficientes.

1.1. Proteínas

As proteínas são compostos orgânicos constituídos por uma cadeia de aminoácidos ligados por ligações peptídicas disponíveis em muitos tamanhos e formatos. São moléculas essenciais à vida que desempenham muitas funções, entre as quais as de regulação, estrutural, sinalização, transporte, movimentação e de catálise. A diversidade de proteínas, principalmente no que diz respeito à sua estrutura tridimensional, deve-se essencialmente ao tamanho da cadeia de aminoácidos e à sequência destes, podendo em alguns casos dever-se também a ligações dissulfeto e à de pequenas moléculas ou iões às cadeias laterais de aminoácidos. Assim, uma determinada sequência linear de aminoácidos irá dobrar-se em apenas uma ou poucas formas tridimensionais estritamente relacionadas denominadas de conformações. A conformação de uma proteína juntamente com as propriedades químicas resultantes das cadeias laterais de aminoácidos determinam a sua função. (Lodish, et al., 2007)

1.1.1. Estrutura das proteínas

Uma concepção chave para o entendimento de como as proteínas funcionam é que a função destas deve-se à sua estrutura tridimensional, sendo que esta é especificada pela sequência de aminoácidos. (Lodish, et al., 2007)

A estrutura primária de uma proteína consiste na ligação linear de aminoácidos através de ligações peptídicas (e ocasionalmente ligações dissulfeto). (Lodish, et al., 2007)

Na estrutura secundária de uma proteína são estabelecidas ligações de hidrogénio entre diferentes segmentos de cadeias polipeptídicas. As estruturas secundárias mais comuns são as do tipo α -hélice e folha- β (Fruton & Simmonds, 1958), (Lodish, et al., 2007).

A estrutura secundária do tipo α -hélice é a mais simples e a mais presente nas proteínas, pois este tipo de estrutura aproveita o facto de, embora as ligações peptídicas sejam rígidas, as restantes ligações são livres para rotação. Além disso, esta otimiza o uso das

ligações de hidrogénio que se formam entre o hidrogénio do grupo amina e o oxigénio do grupo carbonilo do quarto aminoácido que se encontra na terminação amina dessa ligação peptídica. Assim forma-se uma estrutura helicoidal estável.

Um aminoácido (α -aminoácido) apresenta os grupos que o constituem (grupo amina, grupo carboxílico, hidrogénio e um grupo R característico de cada aminoácido) ligados a um carbono denominado centro quiral. Este centro quiral permite que se formem estereoisómeros, mais concretamente enantiómeros, uma situação que ocorre quando dois aminoácidos são a imagem no espelho um do outro. Assim, estes são classificados como L-aminoácidos ou D-aminoácidos, sendo que são estes que determinam se a α -hélice é orientada para a direita ou para a esquerda. No entanto, os aminoácidos constituintes das proteínas são sempre L-aminoácidos, sendo a α -hélice orientada para a direita.

A estrutura secundária do tipo folha- β é um tipo de estrutura secundária comum, tal como a α -hélice, mas em que as cadeias polipeptídicas em forma de ziguezague são dispostas lado a lado. Este arranjo vai dar origem a uma estrutura em forma de pregas onde as ligações de hidrogénio se formam entre os segmentos adjacentes das cadeias polipeptídicas. Esses segmentos das cadeias polipeptídicas podem ainda ser paralelas em que os grupos amina e carboxilo têm a mesma orientação ou antiparalelas em que os grupos amina e carboxilo têm orientação diferentes.

A estrutura terciária de uma proteína ocorre quando se dá um rearranjo tridimensional de todos os átomos presentes numa proteína. Enquanto que na estrutura secundária as ligações estabelecidas são entre átomos “próximos”, na estrutura terciária as ligações estabelecidas são entre átomos mas “distantes” que tanto podem ser devido a interações fracas como devido a ligações covalentes.

Alguns péptidos são constituídos por duas ou mais cadeias polipeptídicas separadas ou subunidades. Uma estrutura quaternária forma-se quando essas subunidades se arranjam em complexos tridimensionais.

A estrutura tridimensional de uma proteína determina a sua função, pois estas são moléculas dinâmicas em que a sua função depende quase sempre da forma como estas interagem com outras moléculas (Nelson & Cox, 2002)

1.1.2. Enzimas

Uma das condições essenciais para a vida é que um organismo deve ser capaz de catalisar reacções químicas de uma forma selectiva e eficiente. Embora as reacções químicas ocorram naturalmente, é através da biocatálise que estas se realizam num espaço de tempo útil capaz de sustentar a vida. Assim, as enzimas são os catalisadores biológicos. Estas são proteínas altamente especializadas que apresentam um alto grau de especificidade em relação ao substrato, aceleram as reacções químicas de uma forma extraordinária sem alterar o seu equilíbrio e são capazes de desempenhar a sua função em meio aquoso sob condições muito suaves de pH e temperatura. Estas propriedades fazem das enzimas catalisadores excepcionais com uma capacidade catalítica muito maior do que os catalisadores inorgânicos e sintéticos.

As enzimas são de uma importância extrema para os processos bioquímicos, pois de uma forma organizada elas catalisam as reacções permitindo transformar de uma forma mais rápida e com menor gasto de energia os macronutrientes em moléculas simples, passíveis de ser absorvidas pelo organismo e utilizadas para produzir macromoléculas biológicas.

O interesse nas enzimas e o seu estudo tem vindo a aumentar nos últimos tempos devido à sua importância prática. Tem-se verificado a existência de doenças genéticas causadas pela actividade anormal, deficiência ou mesmo ausência de uma ou mais enzimas. Assim o estudo e a utilização destas tem-se demonstrado importante, não só na medicina, mas também na indústria química, na agricultura e no processamento de alimentos.

1.1.3. Estrutura e estabilidade das enzimas

Uma enzima tem uma estrutura tridimensional específica, possuindo uma região denominada de centro activo, onde o substrato (reagente) se liga. Assim forma-se o complexo enzima-substrato que, sendo estável permite diminuir a energia de activação, aumentando a velocidade da formação de produtos. Quando há formação de produtos, estes são libertados e a enzima volta a estar disponível para se ligar a outro substrato.

Dado que é a estrutura molecular que determina a função da enzima, isso resulta também numa especificidade da enzima para o substrato. Se a especificidade da enzima é absoluta, significa que só reconhece um único substrato. Por outro lado, se a especificidade é relativa significa que a enzima reconhece um grupo de substratos semelhantes entre si.

1.1.4. Factores que influenciam a actividade enzimática

Existem alguns factores que interferem na actividade das enzimas devido às alterações que estas provocam na estrutura tridimensional das enzimas, afectando assim a sua actividade.

O pH interfere na actividade da enzima, uma vez que provoca alterações na estrutura desta, influenciando a formação do complexo enzima-substrato, e por conseguinte a eficácia enzimática. Assim, cada enzima actua num intervalo de pH óptimo, sendo que para valores fora desse intervalo de pH esta sofre alterações na sua estrutura, impedindo que se ligue ao substrato, dando-se assim a inactivação.

O aumento da temperatura favorece a formação do complexo enzima-substrato devido ao aumento de choques entre moléculas, logo favorecendo por conseguinte a transformação dos reagentes em produtos. No entanto, para temperaturas muito altas, acima de um determinado limite dá-se a desnaturação, que ocorre quando existe uma quebra das ligações químicas entre as cadeias polipeptídicas impedindo que a enzima actue.

Por vezes a enzima para além da proteína (constituída por aminoácidos) contém também na sua constituição um cofactor, sendo essa enzima designada de apoenzima. Neste caso, a enzima só se encontra funcional quando a proteína (apoenzima) e o cofactor se encontram associados, passando a denominar-se de holoenzima. O cofactor pode ser de natureza orgânica ou inorgânica (Mg^{2+} , Ca^{2+} , entre outros), sendo que quando é de natureza orgânica designa-se por coenzima.

Existem vários compostos que se podem ligar a uma enzima afectando a sua actividade e conseqüentemente aumentando ou diminuindo a sua actividade. Quando os compostos diminuem a actividade são denominados de inibidores e podem ser naturais ou artificiais, sendo os artificiais muito utilizados na indústria alimentar.

Existem inibidores reversíveis e irreversíveis, sendo que estes últimos ligam-se permanentemente aos centros activos das enzimas, impedindo a formação do complexo enzima-substrato, impedindo totalmente a actividade da enzima.

No caso dos inibidores reversíveis podem-se considerar de dois tipos de inibição: a inibição competitiva em que o inibidor possui estrutura semelhante ao substrato e vai-se ligar à enzima pelo centro activo, diminuindo assim a velocidade de reacção, e a inibição não

competitiva em que o inibidor se liga à enzima num local que não o centro activo, mas provoca alterações neste, impedindo que se forme o complexo enzima-substrato

Também existem compostos denominados de indutores que aumentam a actividade da enzima, uma vez que provocam mudanças no centro activo que favorecem a formação do complexo enzima-substrato.

1.1.5. Cinética enzimática

Para um melhor conhecimento sobre as enzimas em estudo recorre-se ao estudo da cinética enzimática, uma vez que esta nos permite fazer um estudo dos mecanismos enzimáticos. Quando uma concentração crescente de substrato é adicionada a uma determinada concentração de enzima, a actividade catalítica irá aumentar até que todas as enzimas tenham o seu centro activo ocupado, sendo esta altura quando atinge a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Assim, a concentração de substrato ($[S]$) para a qual a $V_{m\acute{a}x}$ é metade é designada pela constante de Michaelis (K_m) e é uma característica de cada enzima, quando esta actua sobre um determinado substrato.

A equação de Michaelis-Menten,

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

permite determinar a velocidade inicial (V_0) de uma reacção enzimática. Quando ocorre a saturação, a velocidade limite pode ser dada pelo número de renovação (K_{cat}). A relação K_{cat}/K_m fornece uma boa medida de eficiência catalítica (Ribeiro, Silva, & Oliveira, 2005)

1.1.6. α -amilase

Normalmente as enzimas são nomeadas com o nome do substrato que catalisam, seguido do sufixo “-ase”. Assim, a amilase é uma enzima da classe das hidrólases que actua sobre o amido, catalisando as ligações α -1,4 glicosídicas. Com base na especificidade do

substrato, na configuração do produto final e na natureza glicosídica presente no substrato, as amilases podem ser classificadas em diferentes classes, dentre as quais se destacam as α -amilases, β -amilases, isoamilases e pululanases. Uma das mais conhecidas e mais estudada é a classe das α -amilases. A α -amilase (EC 3.2.1.1) é uma endoamilase que catalisa ligações α -(1,4)-D-glucano glucanohidrolases. Esta actua ao longo das cadeias de amido e glicogénio, hidrolisando as ligações α -1,4 formando produtos como a glicose, maltose e dextrinas. É importante evidenciar que sendo as amilases uma das principais enzimas responsáveis na obtenção de energia a partir do amido tanto a nível dos eucariotas como dos procariotas, as α -amilases obtidas a partir de bactérias do tipo *Bacillus* têm sido bastante estudadas para aplicações industriais, uma vez que estas possuem melhores propriedades termoestáveis. Diferentes α -amilases são produzidas por diferentes espécies de *Bacillus*, o que faz com que estas apresentem diferentes características entre si como a temperatura óptima, o pH óptimo e a estabilidade da enzima. Enzimas termoestáveis têm um grande interesse para a indústria do processamento do amido, visto que a gelificação ocorre em torno dos 70°C (Delatorres, Ladeira, Andrade, Barbosa, & Martins, 2010).

1.1.7. Aplicações da α -amilase

A investigação voltada para a α -amilase deve-se sobretudo ao facto desta apresentar uma enorme variedade de aplicações industriais, como por exemplo na indústria alimentar e biotecnologia. Um das aplicações da α -amilase na indústria alimentar é na produção de xaropes ricos em glicose e frutose que depois podem ser utilizados como adoçantes em sumos. A adição de enzimas aquando da preparação do pão pode retardar o envelhecimento deste, fazendo com que fique com um aspecto mais “fresco” por mais tempo e a α -amilase de origem fúngica pode mesmo conceder um maior potencial fermentativo. A vida útil dos produtos também é prolongada com a adição da α -amilase, para além de tornar o pão mais doce, devido ao aumento da quantidade de açúcares na massa. Outras aplicações das amilases na indústria alimentar incluem a produção de cerveja em que ajuda na produção de açúcares, a produção de papas infantis reduzindo a viscosidade das pastas gelificadas de amido e a alimentação animal em que auxilia na digestão. As α -amilases também têm um papel muito importante na indústria têxtil, uma vez que degrada o amido presente nos fios após a tecelagem que tinha sido adicionado para conferir resistência aos fios. As α -amilases são também utilizadas na indústria do papel e da celulose em que o amido é adicionado ao papel para o tornar mais resistente a danos mecânicos que possa sofrer na sua produção e

posteriormente tem de ser retirado (Spier, 2005). Também na indústria dos detergentes, as α -amilases têm sido amplamente utilizadas para remoção de nódoas e comida. Com uma crescente tendência entre os consumidores da utilização de água fria para a lavagem de roupas e loiças, as α -amilases revelaram-se um forte aliado na remoção de nódoas e comida a temperaturas moderadas e pH alcalino (Delatorres, Ladeira, Andrade, Barbosa, & Martins, 2010)

Relativamente à enzima utilizada neste trabalho, trata-se de uma enzima comercial, a α -amilase do *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma-Aldrich, A7595-250mL, Lot#120M1543V). Esta ainda não foi muito estudada, mas permitirá a criação de conhecimento sobre as principais interacções entre este tipo de enzimas e possíveis solventes alternativos para a biocatálise. Para o estudo da actividade enzimática da α -amilase têm sido utilizadas diferentes técnicas, nomeadamente o método do DNS e o do complexo amido-iodo (Young, Hong, & Hatch, 1987).

1.2. Líquidos iónicos

Os líquidos iónicos (ILs) são sais líquidos com um ponto de fusão abaixo dos 100°C. Para além de possuírem características que os tornam solventes “limpos” preferenciais tais como volatilidade extremamente baixa (desprezável a temperatura e pressão normais), gama de temperatura de fase líquida alargada, não inflamabilidade e alta condutividade iónica, existe ainda a possibilidade de se poder desenhar a sua estrutura por alteração do catião e/ou anião tornando-os potencialmente biocompatíveis (Petkovic, Seddon, Rebelo, & Pereira, 2011). Devido às características anteriormente mencionadas, os ILs são conhecidos como solventes “verdes”, sendo que uma das suas potenciais aplicações é como solventes ou co-solventes em reacções biocatalíticas. De facto os ILs mostram-se excelentes solventes não-aquosos para a catálise enzimática devido às vantagens que estes apresentam sobre os outros solventes, tais como maior taxa de conversão dos reagentes em produtos, maior selectividade, maior estabilidade enzimática e melhor recuperação e reciclabilidade (Moninuzzaman, Kamiya, & Goto, 2010).

1.2.1. Aplicações do ILs

A aplicação de ILs em processos industriais tem vindo a crescer ao longo dos últimos anos (Plechkova & Seddon, 2008). No entanto tem-se tornado cada vez mais relevante o

estudo da biocompatibilidade, toxicidade e biodegradabilidade dos ILs. A utilização de catiões do tipo colínio tem mostrado os resultados mais interessantes (Petkovic, et al., 2010).

No que respeita à aplicação de ILs como solventes ou co-solventes de enzimas para a catálise enzimática. Nesses estudos foram testados diferentes ILs e verificar se existe alguma diferença nos resultados quando a enzima está na presença do IL e quando não está. As lípases têm sido das enzimas mais estudadas no uso dos ILs, tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios no que diz respeito à actividade e estabilidade (Tavares, Rodrigues, & Macedo, 2010), purificação e extracção utilizando o sistema bifásico aquoso (ABS) (Ventura, Barros, Barbosa, Soares, Lima, & Coutinho, 2012) (Ventura, Sousa, Freire, Serafim, Lima, & Coutinho, 2011) (Deive, et al., 2011). Embora até à data as lipases tenham sido das enzimas mais estudadas, estudos com outras enzimas também têm sido feitos, tendo-se obtido resultados muito positivos na produção, selectividade e estabilidade das enzimas (Kragl, Eckstein, & Kaftzik, 2002).

A investigação utilizando as amilases está ainda numa fase embrionária de desenvolvimento, quando comparamos com as lípases. As amilases representam um importante grupo de enzimas e a actuação da α -amilase na liquefacção do amido está fortemente relacionada com a sua estabilidade térmica. Assim, tentar entender como os ILs influenciam a actividade da α -amilase pode-nos levar a uma técnica mais eficaz de hidrolisar o amido, que tem importantes aplicações em muitos processos industriais (Dabirmanesh, et al., 2011)

1.2.2. ILs e a α -amilase

A utilização de ILs como solventes ou co-solventes na catálise enzimática, neste caso específico da α -amilase teria inúmeros benefícios, tornando a utilização da α -amilase mais apelativa e competitiva a nível industrial. Como não existem muitos estudos sobre a α -amilase com ILs, foram utilizados uma série de ILs de diferentes “famílias”, como objectivo de identificar as suas características estruturais que potenciem a actividade da enzima, aumentando a taxa de conversão de reagentes em produto, que permita uma maior estabilidade e uma melhor recuperação da enzima.

Este estudo é acima de tudo um estudo exploratório para o desenvolvimento de uma metodologia de análise e interpretação dos resultados que pode no futuro ser aplicada às diversas amilases existentes e que são aplicadas nas mais variadas vertentes da tecnologia alimentar e da biotecnologia.

2. Objectivos

Desde a introdução do conceito de Química Verde na década de 90, biocatálise, utilizando organismos inteiros ou apenas enzimas, têm recebido grande atenção, porque é um processo ambientalmente amigável. Algumas das vantagens significativas envolvidas nestes processos baseiam-se na possibilidade de obtenção de novos compostos de valor acrescentado, na utilização de processos em que os biocatalisadores podem ser recuperados e reutilizados.

Neste contexto, o uso de líquidos iónicos torna-se um marco na busca de solventes industriais verdes. As suas características originais, tais como, a estabilidade térmica, a volatilidade negligenciável, não inflamabilidade e elevada capacidade para dissolver uma vasta gama de compostos químicos estão a acelerar a sua introdução em tecnologias industriais/académico.

Muitos solventes vulgarmente utilizados exibem efeitos tóxicos sobre o biocatalisador e são prejudiciais para o ambiente. Assim, os líquidos iónicos têm um uso potencial excepcionalmente interessante como meios reaccional para transformações enzimáticas. A sinergia entre os líquidos iónicos e enzimas constitui uma alternativa mais verde para a síntese orgânica tradicional que oferece as ferramentas adequadas para a transformação industrial de materiais naturais ou sintéticos em condições moderadas de reacção.

Além de vários resultados encorajadores na catálise enzimática isolada, tais como, o aumento da estabilidade e enantioselectividade, alguns líquidos iónicos demonstraram ser solventes não tóxicos e amigos do ambiente, suportando a sua utilização em processos biocatalíticos .

As amílases representam um dos grupos mais importantes de enzimas dentro do campo da biotecnologia. A eficácia da actividade de α -amilase no processo de decomposição do amido em açúcares a alta temperatura é muito dependente da estabilidade térmica da

enzima. Até à data, o conhecimento do efeito dos líquidos iónicos sobre a estabilidade e a actividade da amilase é escasso. Este trabalho é fundamental para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e sustentáveis para a hidrólise do amido.

Assim, os objectivos principais desta dissertação são:

- 1 - Síntese de novos líquidos iónicos biocompatíveis.
- 2- Desenvolvimento e validação de novos métodos para avaliar a actividade enzimática em líquidos iónicos.
- 3- Análise do efeito dos líquidos iónicos sobre a estrutura e o potencial biocatalítico nas proteínas.
- 4 - Extracção de enzimas utilizando líquidos iónicos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

As soluções de amido, de *color reagent solution* e de tampão fosfato-salino utilizadas no método DNS foram preparadas de acordo com o protocolo da Sigma-Aldrich, utilizando os reagentes indicados (Sigma-Aldrich, 2012).

A solução armazenada de iodo foi preparada de acordo com a referência (Young, Hong, & Hatch, 1987)

As soluções de aminoácidos foram preparadas utilizando: Glicina (Fluka, $\geq 99.0\%$), L-Alanina (Fluka, produto de referencia) e L-lisina (Sigma, $\geq 98\%$).

Os ILs utilizados foram tanto comerciais como sintetizados em laboratório (ver lista de ILs).

Os ABS foram obtidos utilizando os seguintes sais: fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4) (Sigma-Aldrich, $\geq 98.0\%$), cloreto de potássio (KCl) (Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$), cloreto de sódio (NaCl) (Panreac, $\geq 99.5\%$), sulfato de sódio (Na_2SO_4) (Fluka, $\geq 99.0\%$), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Fluka, $\geq 99.0\%$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$) e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) (Sigma, $\geq 99.0\%$).

Foi utilizada água destilada em todos os procedimentos.

Sempre que se pretendia utilizar um IL, este era previamente colocado sob vácuo a temperatura moderada (40 a 70 °C, consoante o líquido iónico) (*Figura 1*), para remover a água ou outros solventes residuais que este pudesse conter.



Figura 1. Sistema de vácuo para secagem dos líquidos iônicos.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação da solução de enzima

A α -amilase utilizada neste trabalho foi a α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma-Aldrich, A7595-250mL, Lot#120M1543V). Embora a sua temperatura e pH ótimos sejam respectivamente 65°C e 5.9, nos métodos utilizados foi usada uma temperatura de 25°C e um pH de 6.9, uma vez que pretendemos analisar o desempenho desta enzima às condições ambiente.

Embora o tampão de fosfato salino utilizado tivesse sempre um pH de 6.9, no método do DNS este apresentava uma concentração de 20 mM enquanto que no método do complexo de amido-iodo este tinha o dobro da concentração (40 mM).

3.2.2. Determinação da curva de calibração para quantificação de proteínas em solução (método de Bradford)

Este método consiste na ligação do azul de Coomassie presente no reagente de Bradford (Sigma) utilizado à proteína (enzima), o que resulta num aumento da absorvância a 595nm (Bradford, 1976).

Procedimento:

Numa cuvete misturar 200µl de reagente Brandford com 800µL de solução de enzima (fazendo triplicados). Fazer o branco com 800µL de solução de enzima e 200µl de água destilada. Ao fim de 50 minutos mede-se a absorvância das amostras ao comprimento de onda de 595 nm. Coloca-se a cuvete 1 minuto antes da leitura no espectrofotómetro (UV-1800 UV-VIS Spectrophotomer) para estabilizar. A concentração de proteína presente na amostra é calculada com base numa curva de calibração obtida através do método de Bradford.

3.2.3. Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

O método DNS descrito por (Dabirmanesh, et al., 2011) consiste na quantificação da quantidade de maltose formada. Para isso foi utilizada uma solução de enzima diluída 40000x (que corresponde a uma concentração de 20 nM) e foram testadas três concentrações de cada líquido iónico (0.9 M; 0.75 M e 0.5 M).

Procedimento:

A enzima é colocada em contacto com o IL durante 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente são adicionados 100 µL da mistura anterior de enzima com IL a 100 µL de substrato (1% p/v) e a reacção ocorre durante 6 min a 25 °C. Para parar a reacção são adicionados 100 µL de *color reagent solution* à mistura reaccional anterior e esta é termostaticada durante 15 min a 100 °C. Esta mistura é colocada em gelo para mais rapidamente atingir a temperatura ambiente. A leitura da absorvância é feita a 540 nm num espectrofotómetro UV-VIS (adicionados 900 µL água para completar o volume).

3.2.4. Método do complexo amido-iodo

O método descrito por (Young, Hong, & Hatch, 1987) consiste na quantificação da quantidade de amido presente em solução. Para isso foram testadas três diferentes concentrações de IL (0.9 M; 0.75 M; 0.5 M) e uma diluição de enzima de 8000x (que corresponde a 100 nM).

Procedimento:

A enzima é colocada em contacto com o IL por 15 min. A reacção ocorre durante 6 ou 10 min a 25 °C ao adicionar 100 µL da mistura anterior de enzima com IL a 800 µL de substrato (1% p/v). Para parar a reacção adiciona-se 1000 µL de HCl (0.1 M) à mistura reaccional anterior. A 100 µL da mistura anterior são adicionados a 1000 µL de uma solução diluída de iodo (1% em I₂ e 10% em KI). A leitura da absorvância a 620 nm é feita num espectrofotómetro UV-VIS.

3.2.5. FT-IR (Infravermelho por Transformada de Fourier)

O FT-IR (infravermelho por transformada de Fourier) é um tipo de espectroscopia de absorção na zona espectral do infravermelho utilizada para identificar a composição de uma determinada amostra baseando-se para isso nas frequências das vibrações químicas que resultam das ligações químicas entre os átomos.

Com base em trabalhos anteriores (Deive, et al., 2011), o FT-IR tornou-se um instrumento útil para permitir verificar se a estrutura secundária de uma proteína é alterada baseando-se para isso nas bandas que permitem identificar as ligações α -hélice e a folha- β . Assim, o FT-IR foi utilizado neste trabalho com esse propósito.

Procedimento:

As amostras foram preparadas com as respectivas quantidades de IL e da diluição de enzima (4×10^4) nas concentrações de 0.5, 0.75 e 0.9M. Foram efectuados brancos de cada uma das concentrações de IL, da enzima e da água. O aparelho de FT-IR utilizado foi um espectrómetro da Bruker- IFS66-S utilizando células de líquidos. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente no formato DTGS de $4000-500\text{cm}^{-1}$, com uma resolução de 2cm^{-1} , tendo-se realizado para o efeito 250 varrimentos e tendo sido efectuado um branco com ar. Os dados foram processados recorrendo ao software OPUS 5.5 (Bruker) e ao software OriginPro 8.

3.2.6. Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF)

A estrutura e o potencial biocatalítico das proteínas está intimamente ligado com o dobramento de proteínas que pode ser estudado por meio da análise da temperatura do ponto médio de desnaturação térmica (T_m), a temperatura à qual a concentração de proteína no estado nativo e desnaturado é a mesma (Rodrigues, Prosinecki, Marrucho, Rebelo, & Gomes, 2011). Considerando o facto de que as interacções entre proteínas e solventes afectam a conformação da enzima a diferentes níveis, o estudo do comportamento ao nível estrutural das proteínas num meio contendo líquidos iónicos é de grande importância, uma vez que as enzimas podem ser tanto destabilizadas como estabilizadas dependendo do meio ambiente. O DSF é utilizado para caracterizar as transições térmicas relacionadas com a estabilidade da proteína através da medida do T_m , onde se utiliza uma sonda exógena que tem afinidade pelas zonas hidrofóbicas da proteína que são expostas à medida que a proteína desenrola.

Procedimento:

O procedimento foi baseado na referência (Rodrigues, Prosinecki, Marrucho, Rebelo, & Gomes, 2011)

As amostras a analisar foram aquecidas entre 20 e 90 °C com uma velocidade de aquecimento de 1.5 °C min⁻¹ utilizando um termofluorímetro Bio Rad IQ5 Multicolor Real-Time PCR. A concentração de enzima utilizada foi de 18.2 µM.

3.2.7. Sistema Bifásico Aquoso (ABS)

O sistema aquoso bifásico é um método alternativo e biocompatível ao método de extracção líquido-líquido que permite a recuperação e a purificação de biomoléculas, tais como, por exemplo enzimas. No ABS convencional formam-se duas fases aquosas que se separam acima de uma determinada concentração de sal-sal, polímero-sal ou polímero-polímero. Com base em trabalhos previamente efectuados, (Shahriari, et al., 2013) foram estudados ABSs utilizando líquidos iónicos e sais, com a finalidade de se verificar se a enzima era extraída da fase contendo líquido iónico para a fase contendo o sal inorgânico mantendo a sua actividade após a extracção.

Procedimento:

Foram colocadas 0.65979 g de ChCl numa ampola de decantação. Posteriormente foram adicionados 3.911 mL de água destilada e 500 μ L de diluição de enzima 8×10^2 . A solução foi agitada para proporcionar um melhor contacto entre o IL e a enzima. Depois foi adicionado o sal lentamente/em pequenas porções agitando até que se verificasse a separação das fases. Cada uma das fases foi pesada. Foi recolhida uma amostra de 300 μ L de cada uma das fases e procedeu-se ao teste da actividade catalítica da enzima através do método de complexo amido-iodo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Capítulo 1: Actividade enzimática

4.1.1. DNS

Para determinar a concentração óptima de α -amilase a utilizar foram efectuados estudos cinéticos variando a concentração de enzima garantindo que existisse uma relação linear entre a absorvância medida a 540 nm e o tempo de reacção. Desta forma garante-se que a concentração de enzima seleccionada é adequada à quantidade de substrato presente nas amostras e no intervalo de tempo de reacção (*Figura 2*).

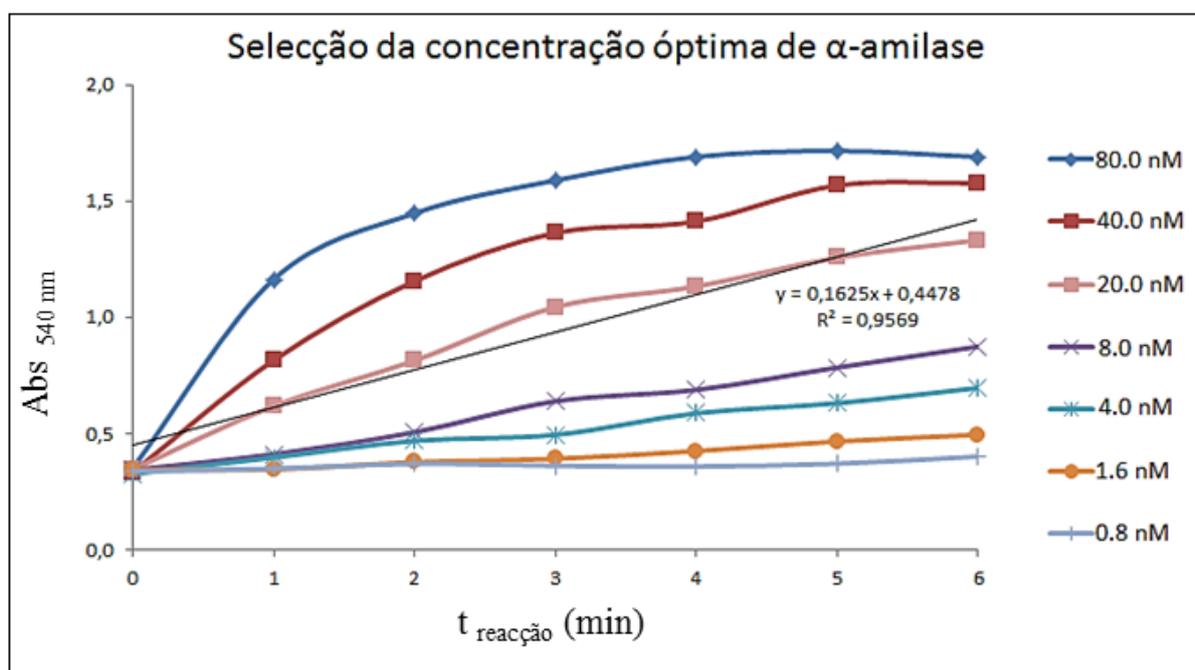


Figura 2. Determinação da concentração óptima de α -amilase com base na absorvância em função do tempo para o método de DNS.

Os ILs testados foram seleccionados a partir de ILs comerciais e sintetizados em laboratório, tentando ter uma abordagem generalizada com diferentes ILs e entre algumas “famílias” em particular.

Tabela 1. Lista de líquidos iónicos utilizados para o método de DNS.

| Líquidos iónicos comerciais | Líquidos iónicos sintetizados |
|--|---|
| ChCl | ChOAc |
| C ₄ MIMCl | C ₂ ChOAc |
| C ₆ MIMCl | C ₃ ChOAc |
| C ₈ MIMCl | C ₅ ChOAc |
| C ₁₀ MIMCl | ChAla |
| (C ₂ OH)MIMCl | ChGli |
| Benzyl MIMCl | ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIMHSO ₄ | ChC ₂ SO ₃ |
| C ₂ MIMC ₁ SO ₄ | C ₂ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIMC ₈ SO ₄ | C ₃ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIM[N(CN) ₂] | C ₄ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₄ MIM[N(CN) ₂] | C ₅ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₄ MIMBr | |
| C ₂ C ₁ MIMBr | |
| C ₂ MIMOTf | |
| C ₂ C ₁ MIMOTf | |
| C ₂ MIMLact | |
| C ₂ MIM(C ₁) ₂ PO ₄ | |
| C ₂ MIM(C ₂) ₂ PO ₄ | |

Para verificar a actividade da α -amílase na presença de líquidos iónicos foi utilizado o método do DNS, que consiste na quantificação de maltose (dissacarídeo) formada, visto que este é um dos produtos resultantes da degradação do amido. A formação de maltose é passível de ser quantificada através da alteração da cor da amostra recorrendo a um espectrofotómetro (*Figura 3*).

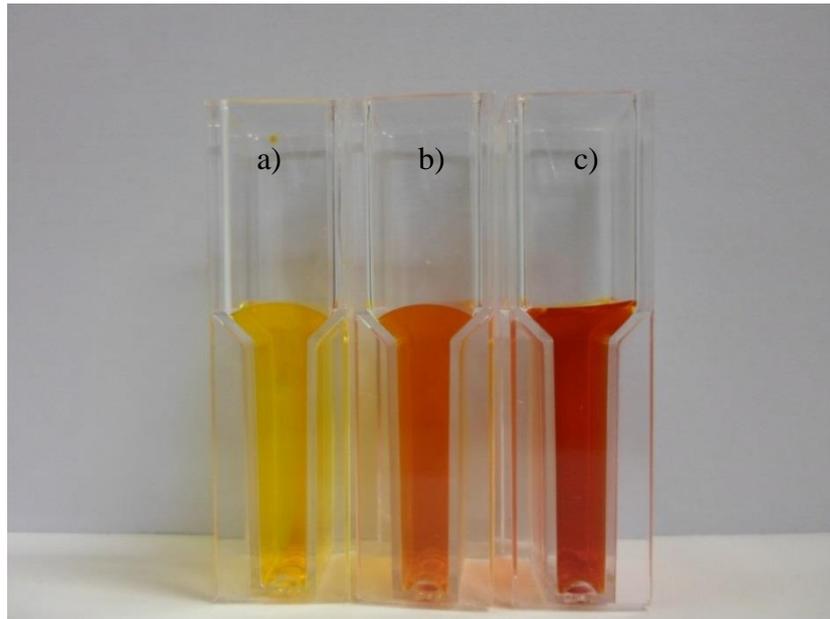


Figura 3. Gradação da cor pelo método DNS a) negativo, b) c) positivo.

Para efectuar a medição da actividade pelo método do DNS (*Figuras 4 e 5*), os ensaios são sempre feitos em triplicados e com os respectivos brancos: branco (BB) constituído unicamente por água destilada, substrato de amido e *color reagent solution*, branco de enzima (BE) constituído por água destilada, substrato de amido, *color reagent solution* e enzima, branco de IL (BIL) constituído por água destilada, substrato de amido, *color reagent solution* e IL. A amostra (A) é constituída por água destilada, substrato de amido, *color reagent solution*, enzima e IL.

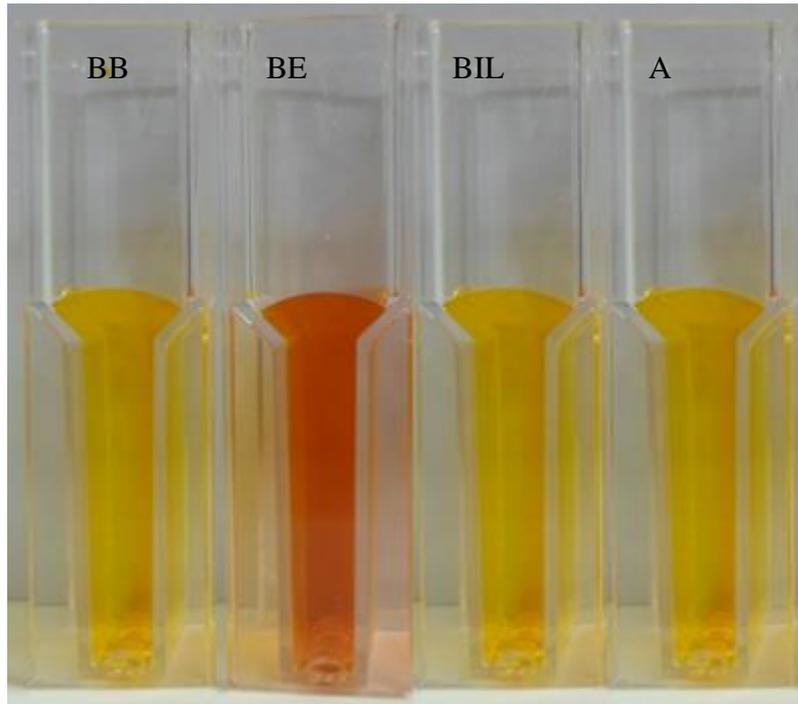


Figura 4. Ensaio de DNS com resultado negativo.

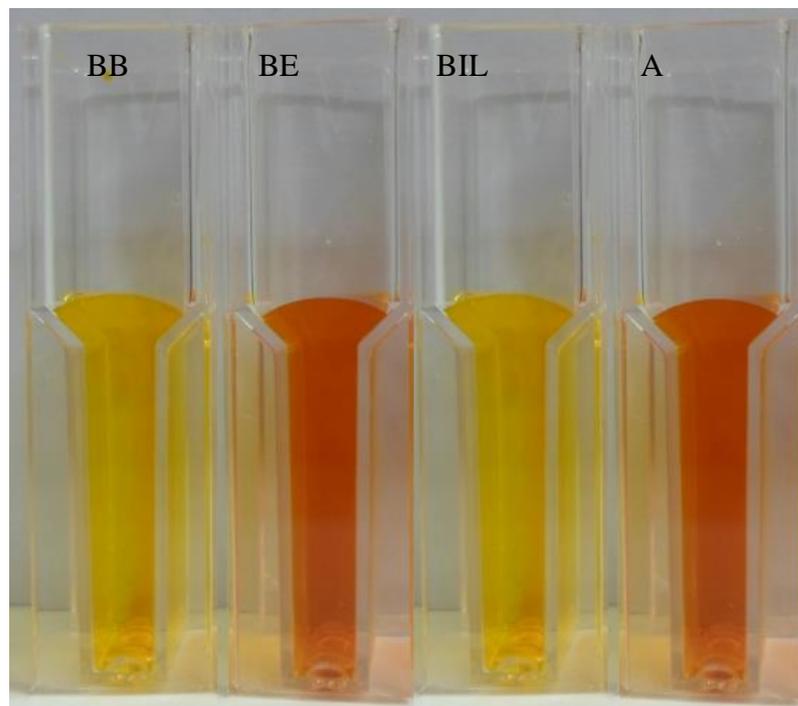


Figura 5. Ensaio de DNS com resultado positivo.

Resultados

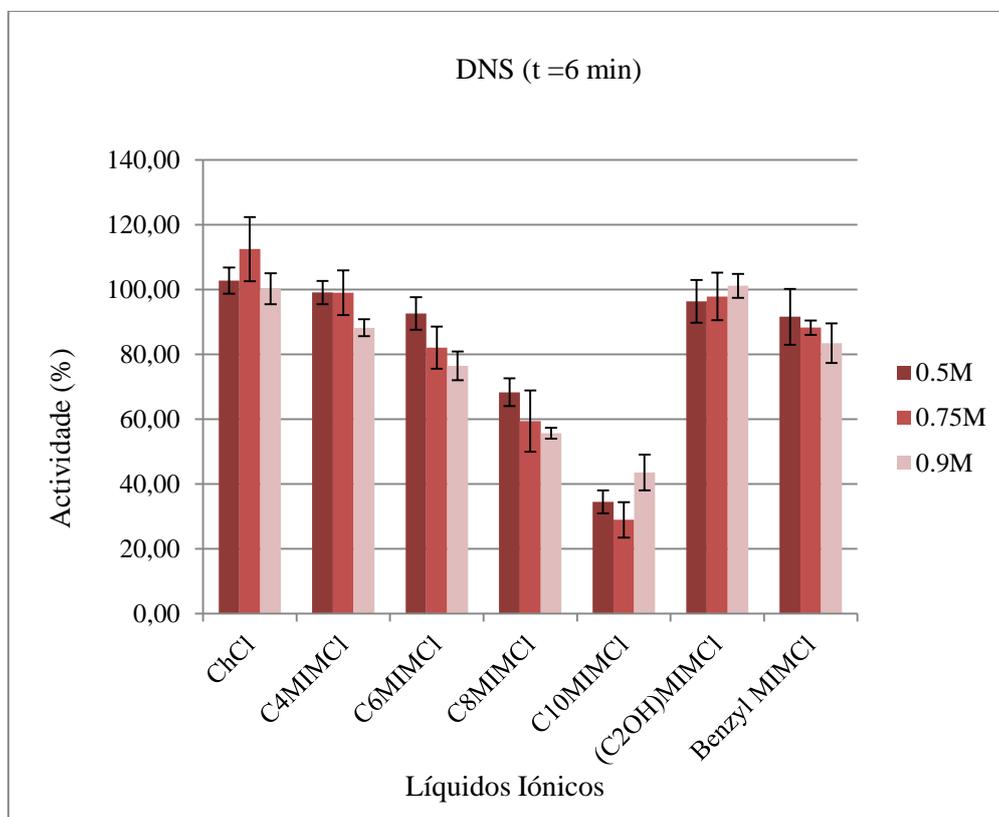


Figura 6. Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião cloreto.

Analisando os resultados relativos aos ILs com anião cloreto (**Figura 6**) é possível concluir que quanto maior é a cadeia alquílica do catião, menor é a actividade da enzima. É possível verificar com base nos gráficos que o IL que apresenta melhor actividade é o cloreto de colina (ChCl). A biocompatibilidade deste líquido iónico representa uma mais-valia numa possível futura aplicação.

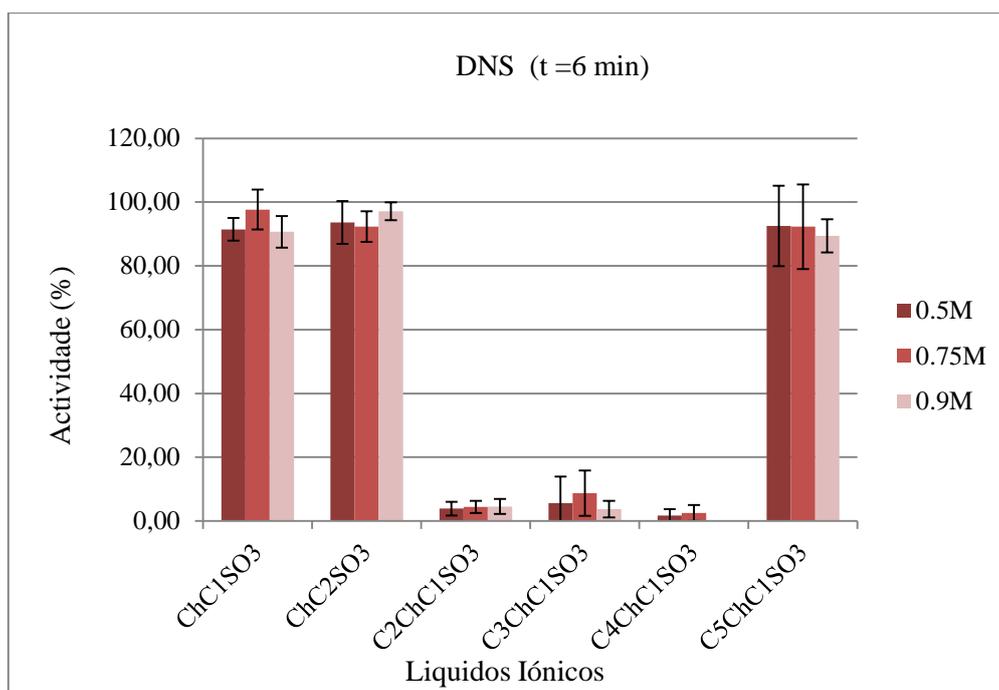


Figura 7. Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião sulfonato.

Na análise dos resultados dos ILs com anião sulfonato (**Figura 7**) não é possível estabelecer uma relação entre o comprimento da cadeia alquílica do catião e a actividade da enzima, pois tanto o ChC_1SO_3 como o $\text{C}_5\text{ChC}_1\text{SO}_3$ apresentam uma actividade de aproximadamente 90%, enquanto os $\text{C}_2\text{ChC}_1\text{SO}_3$, $\text{C}_3\text{ChC}_1\text{SO}_3$ e $\text{C}_4\text{ChC}_1\text{SO}_3$ registam uma actividade abaixo dos 10%. É interessante reparar que não existe uma diferença significativa das actividades entre o ChC_1SO_3 e o ChC_2SO_3 , em que a diferença entre os ILs é que numa posição um tem o grupo C_1 e o outro possui o grupo C_2 . Já quando comparamos a actividade do ChC_2SO_3 (90% de actividade) com a do $\text{C}_2\text{ChC}_1\text{SO}_3$ (5% de actividade) verifica-se uma enorme diferença se tivermos em consideração que a única diferença entre os ILs é a troca de posição dos grupos C_1 e C_2 . Assim pode-se concluir que não é só o tamanho das cadeias alquílicas que importa, mas também a posição em que estas se encontram.

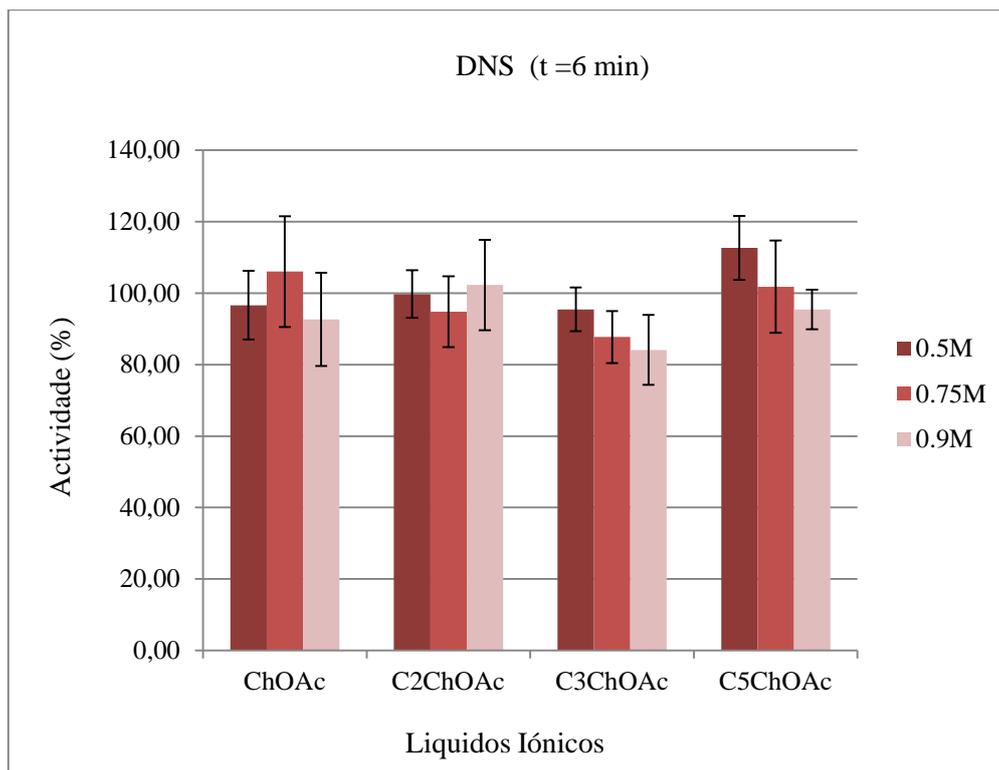


Figura 8. Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião acetato.

Pela análise dos resultados pelo método do DNS dos ILs com anião acetato (**Figura 8**) é possível verificar que independentemente do tamanho da cadeia alquílica presente no catião a actividade da α -amílase na presença de cada um dos ILs não sofre significativas alterações, rondando de uma forma geral os 100%. É de salientar que também nestes ILs o catião é do tipo colina.

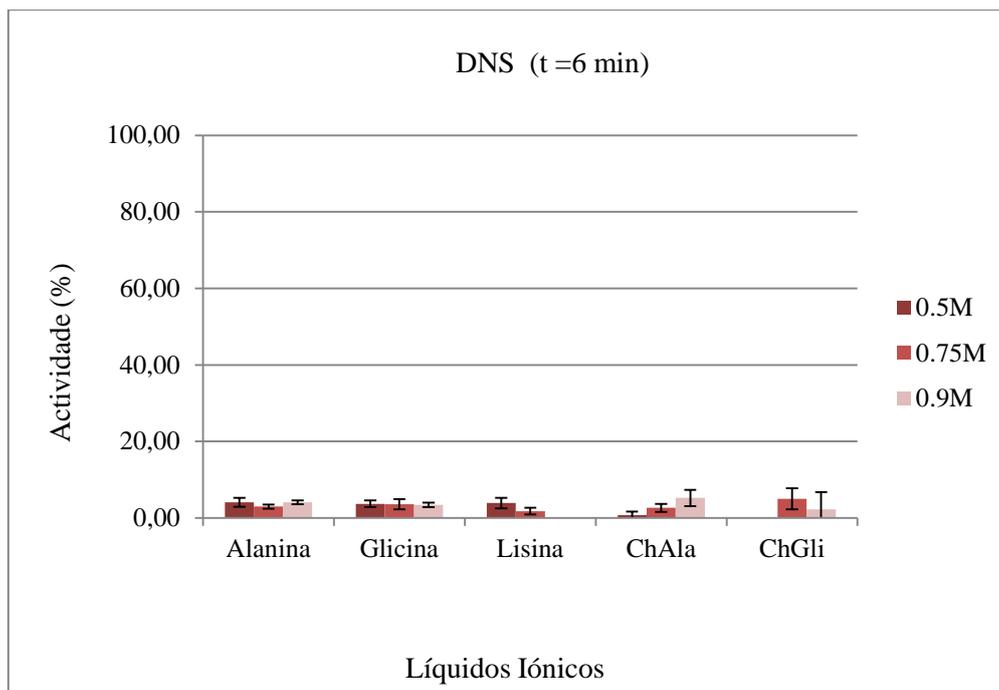


Figura 9. Resultados pelo método do DNS dos ILs com anião aminoácido.

A **Figura 9** apresenta a actividade da enzima na presença dos aminoácidos Alanina, Glicina e Lisina e de líquidos iónicos baseados nestes mesmos aminoácidos, ChAla e ChGli. Assim pode-se concluir que tanto as soluções de aminoácidos como os ILs (ChAla e ChGli) interferem com a actividade da α -amilase, fazendo com que a actividade desta baixe para valores inferiores a 10%. Este resultado contradiz o efeito destes mesmos ILs no aumento em mais de 50% da actividade catalítica das lipases comparativamente à sua actividade em solução aquosa (Deive, et al., a ser submetido) com estes solventes.

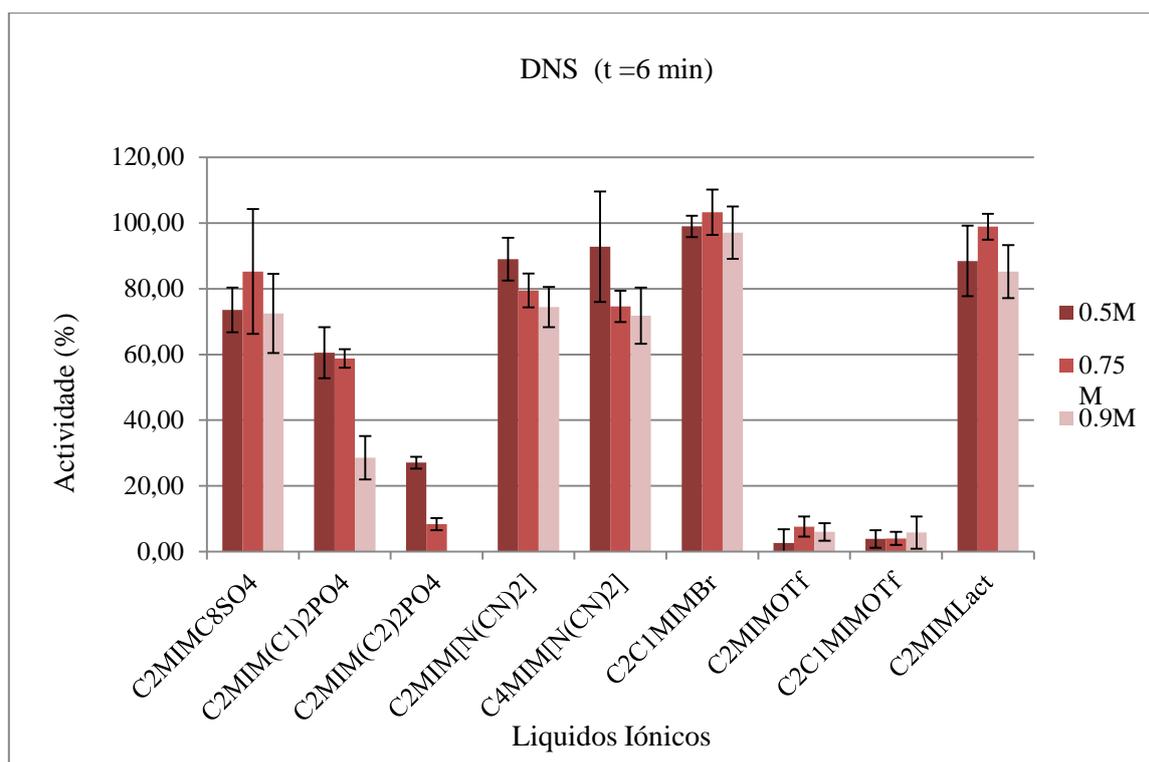


Figura 10. Resultados pelo método do DNS de outros ILs.

Outros ILs de diferentes “famílias” também foram testados (**Figura 10**), mas como o número de ILs pertencentes a uma mesma “família” é pequeno, é mais difícil de retirar conclusões no que diz respeito ao modo como aquele grupo afecta a actividade da α -amílase.

Embora este método seja largamente utilizado pela comunidade científica para a catálise enzimática, no decorrer deste trabalho foi possível verificar que um dos reagentes utilizados neste método, mas concretamente o ácido 3,5-dinitrosalicílico presente no *color reagent solution* reagia com alguns ILs (**Tabela 2**) formando precipitados.

Tabela 2. Lista de ILs que reagem com o ácido 3,5-dinitrosalicílico.

| | | |
|--|--------------------------------------|--|
| ChH ₂ PO ₄ | C ₄ C ₁ MIMOTf | C ₂ C ₁ MIMBF ₄ |
| C ₂ MIMC ₁ SO ₄ | C ₄ MIMBr | C ₄ MIMBF ₄ |
| (C ₂ OH)MIMBF ₄ | C ₂ MIMHSO ₄ | C ₄ C ₁ MIMBF ₄ |

4.1.2. Complexo amido-iodo

A reacção de alguns ILs utilizados com o DNS levou à necessidade de implementar outro método de medida da actividade enzimática. O método escolhido foi o do complexo amido-iodo que é também muito utilizado para a catálise enzimática. Este método consiste em medir a quantidade de amido que existe na amostra através de um complexo que este forma com o iodo, adquirindo a amostra uma cor azul-escura. Por si só este método apresenta uma vantagem clara sobre o anterior, pois enquanto o DNS só é efectivo se houver produção de maltose, este baseia-se na degradação do amido, independentemente dos produtos que se formam.

Depois de se fazer a respectiva curva de calibração para determinar a quantidade de amido a ser usado na amostra procedeu-se à determinação da concentração óptima da α -amilase (*Figura 11*) através de uma serie de cinéticas variando a diluição de enzima.

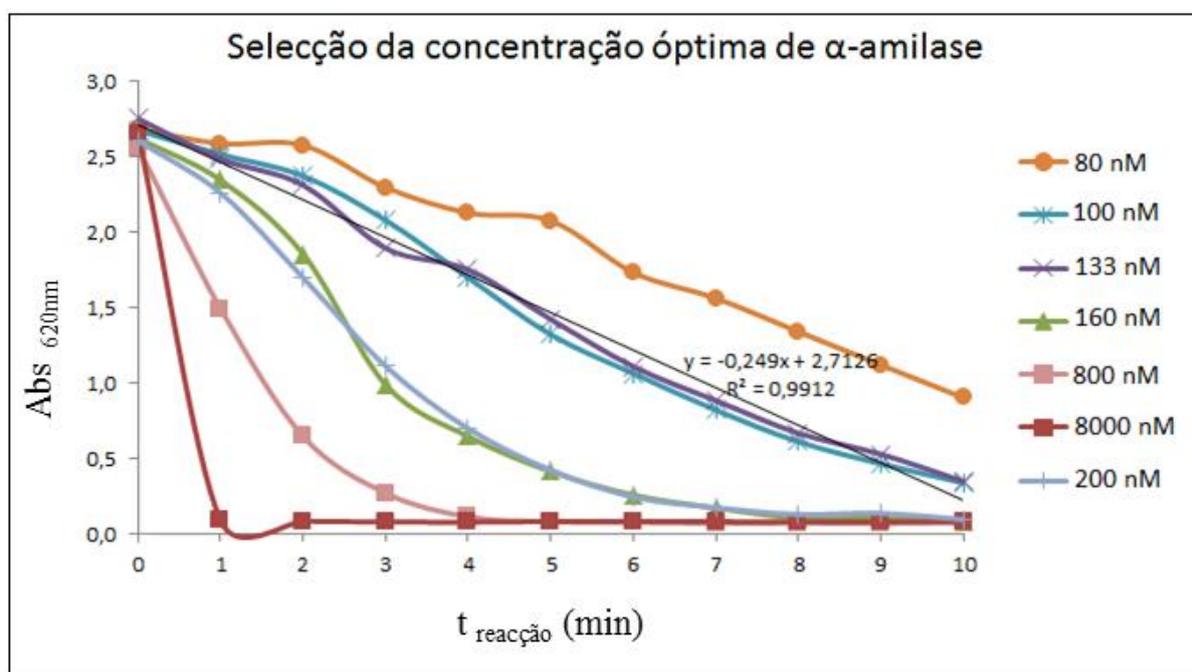


Figura 11. Determinação da concentração óptima de α -amilase com base na absorvância em função do tempo para o método de complexo amido-iodo.

Para este método tentou-se utilizar todos os ILs que tinham sido utilizados no método anterior e outros que se consideraram interessantes.

Tabela 3. Lista de líquidos iónicos utilizados pelo método do complexo amido-iodo.

| Líquidos iónicos comerciais | Líquidos iónicos sintetizados |
|--|--|
| ChCl | ChAla |
| C ₂ MIMCl | ChGli |
| C ₄ MIMCl | ChOAc |
| C ₆ MIMCl | C ₂ ChOAc |
| C ₈ MIMCl | C ₃ ChOAc |
| (C ₂ OH)MIMCl | C ₄ ChOAc |
| Benzyl MIMCl | C ₅ ChOAc |
| C ₂ MIMOTf | ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ C ₁ MIMOTf | C ₃ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ C ₁ MIMOTf | C ₅ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIMHSO ₄ | C ₂ MIMC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIMC ₁ SO ₄ | C ₂ MIMC ₂ SO ₃ |
| C ₂ MIMC ₈ SO ₄ | C ₂ MIMC ₄ SO ₃ |
| C ₂ MIMOAc | |
| C ₄ MIMBr | |
| C ₂ C ₁ MIMBr | |
| C ₂ PyridiniumBr | |
| (C ₂ OH)MIMBF ₄ | |
| C ₄ MIMBF ₄ | |
| C ₄ C ₁ MIMBF ₄ | |
| C ₂ MIM[N(CN) ₂] | |
| C ₄ MIM[N(CN) ₂] | |
| C ₂ MIM(C ₁) ₂ PO ₄ | |
| C ₂ MIM(C ₂) ₂ PO ₄ | |
| C ₂ MIMLact | |

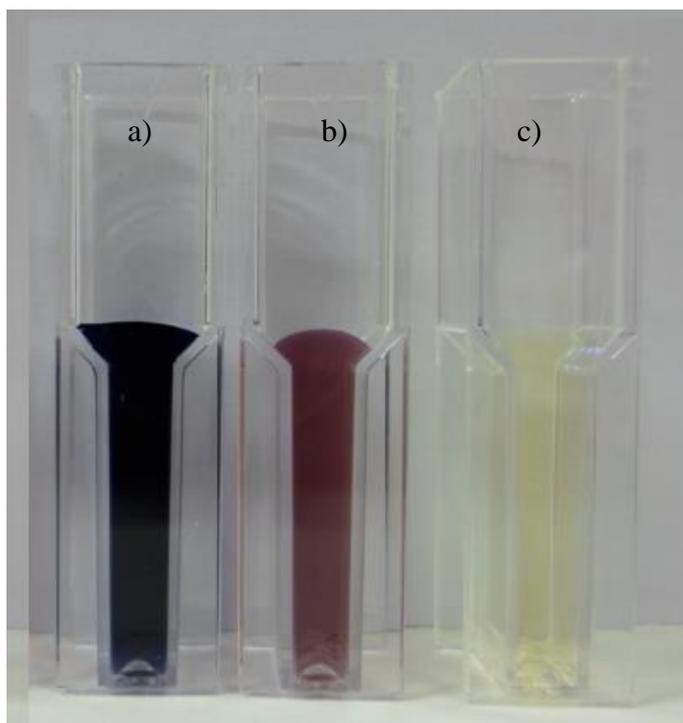


Figura 12. Gradação da cor pelo método do complexo amido-iodo, a) negativo, b) e c) positivo.

À semelhança do método do DNS, para se efectuar a medição da actividade pelo método do complexo amido-iodo (**Figuras 13 e 14**), os ensaios são sempre feitos em triplicados e com os respectivos brancos: branco zero (B0) constituído unicamente por água e iodo, branco (BB) constituído por substrato de amido, água, ácido clorídrico e iodo, branco de enzima (BE) constituído por substrato de amido, água, enzima, ácido clorídrico e iodo, branco de líquido iónico (BIL) constituído por substrato de amido, água, IL, ácido clorídrico e iodo. A amostra (A) é constituída por substrato de amido, enzima, IL, ácido clorídrico e iodo.

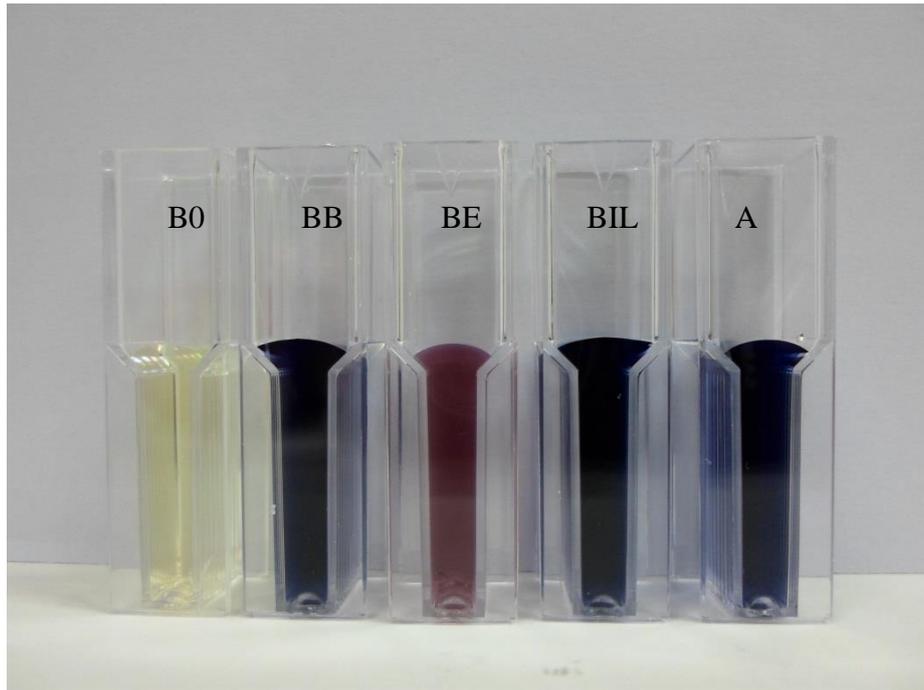


Figura 13. Ensaio do complexo amido-iodo com resultado negativo.

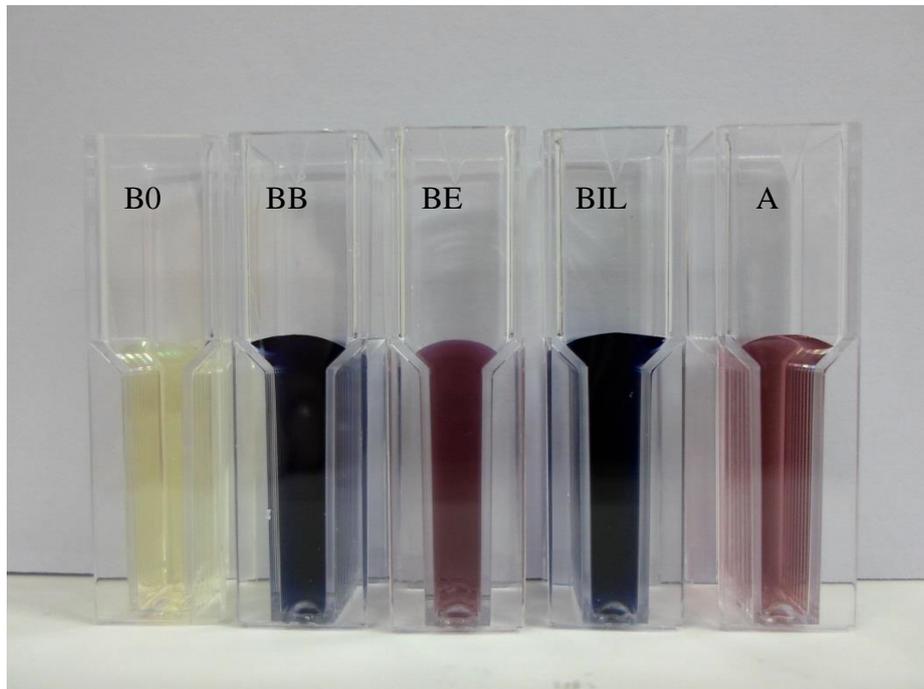


Figura 14. Ensaio do complexo amido-iodo com resultado positivo.

Resultados

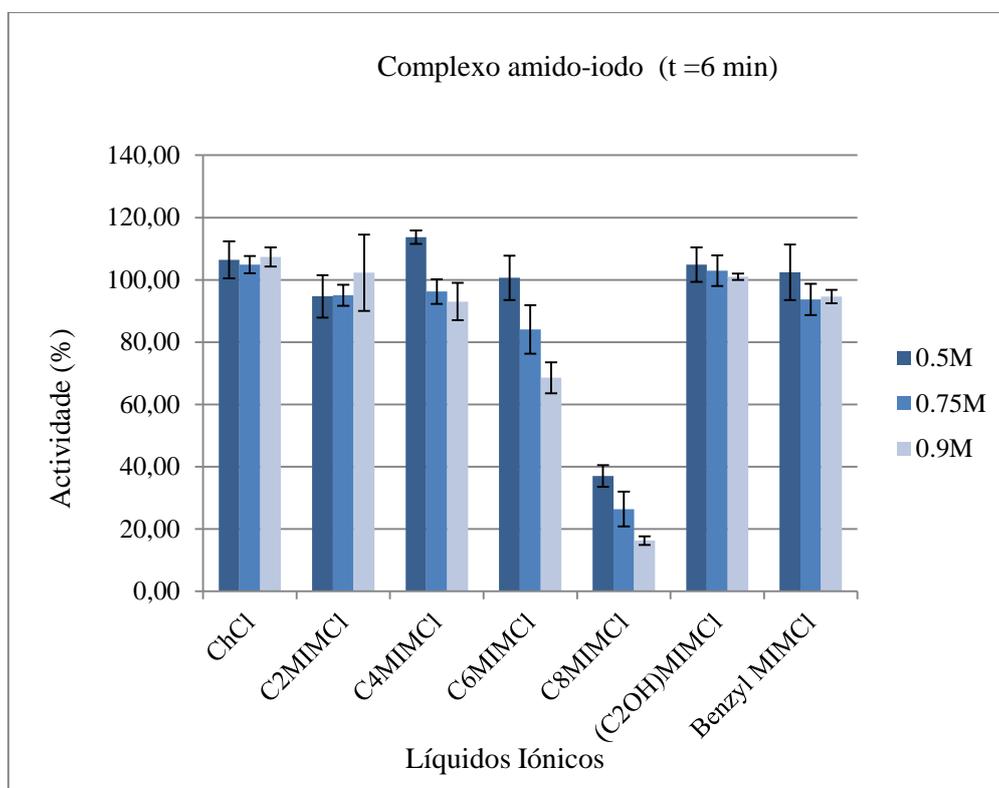


Figura 15. Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs dos com anião cloreto.

Tal como pelo método do DNS, a conclusão que é possível retirar dos resultados relativos aos ILs dos cloretos (**Figura 15**) é que, quanto maior a cadeia alquílica do catião, menor é a actividade da enzima, destacando-se mais uma vez o cloreto de colina (ChCl).

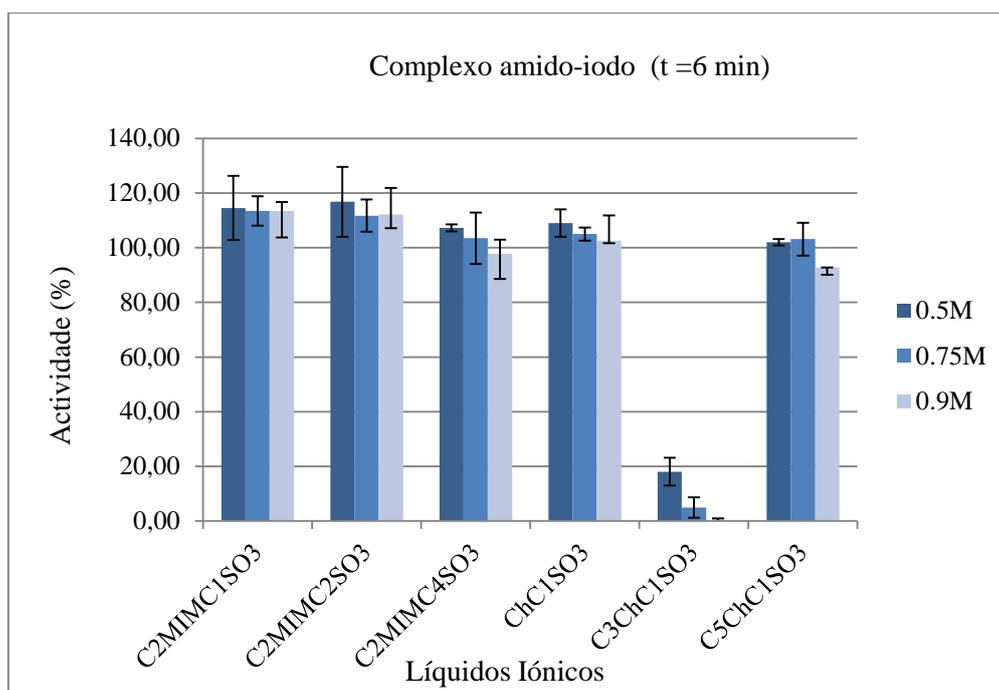


Figura 16. Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião sulfonato.

Através da análise dos resultados dos ILs dos sulfonatos (**Figura 16**) não é possível estabelecer uma relação entre o comprimento da cadeia alquílica do catião e a actividade da enzima, visto que tal como no DNS o ChC_1SO_3 e o $\text{C}_5\text{ChC}_1\text{SO}_3$ apresentam uma actividade de aproximadamente 100%, enquanto os $\text{C}_3\text{ChC}_1\text{SO}_3$ apresenta uma actividade superior neste método, quando comparado com os resultados do DNS, mas mesmo assim inferior aos dois anteriores. No caso dos ILs que contêm o grupo imidazólio ($\text{C}_2\text{MIMC}_1\text{SO}_3$, $\text{C}_2\text{MIMC}_2\text{SO}_3$ e $\text{C}_2\text{MIMC}_4\text{SO}_3$) todos apresentam actividades muito boas em geral superiores a 100%. Mais uma vez o decréscimo que se verifica no $\text{C}_2\text{MIMC}_4\text{SO}_3$ pode ser devido ao grupo C_4 que este apresenta reforçando a importância do tamanho da cadeia alquílica que constitui o IL na actividade da enzima.

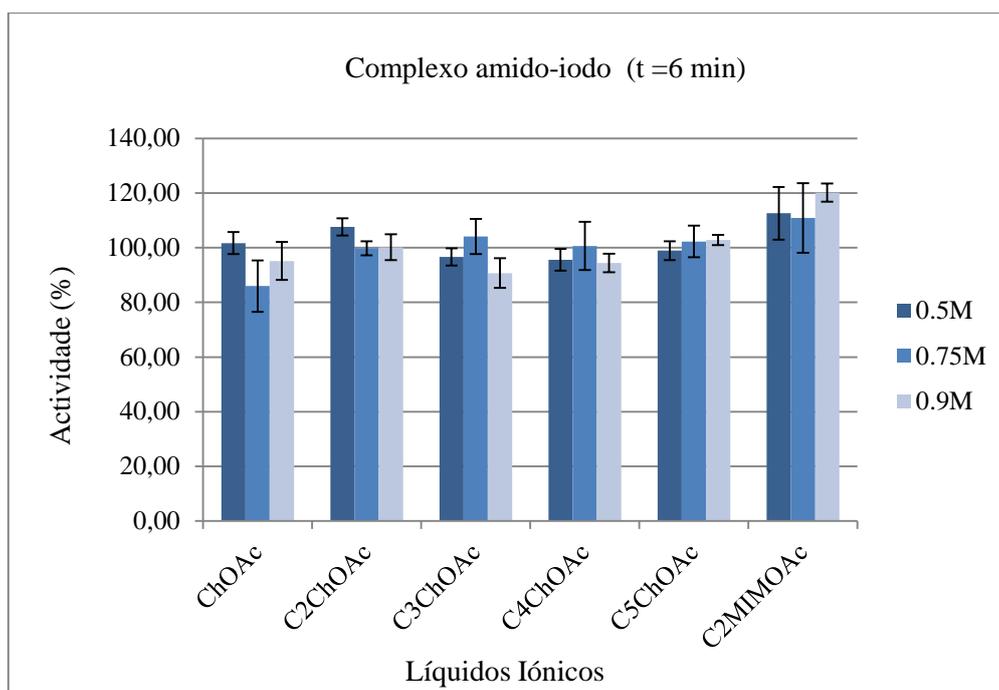


Figura 17. Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião acetatos.

Analisando os resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs dos acetatos (**Figura 17**) verifica-se que estes refletem os resultados do método do DNS.

É de realçar o C₂MIMOAc que não foi testado pelo método do DNS, mas que neste método atinge valores maiores do que a actividade da água, da ordem dos 120%. No caso de ILs que contêm o grupo acetato como anião, verifica-se que não há qualquer interferência deste com a actividade da enzima, independentemente de o catião ser do tipo colina ou imidazólio. Este resultado é semelhante ao verificado para ILs com aniões cloreto e sulfonato.

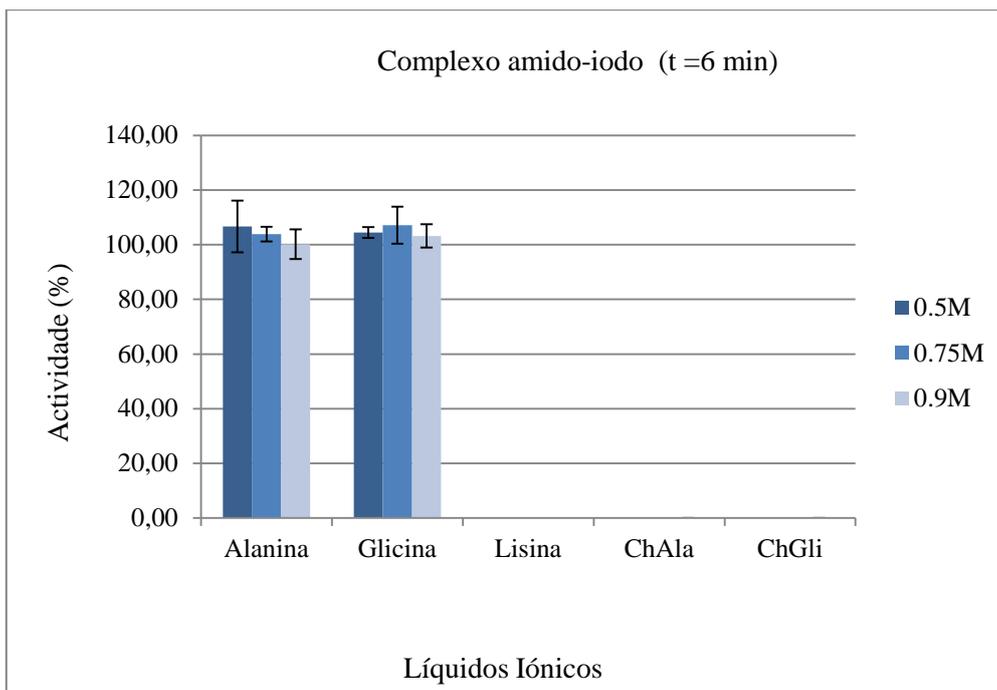


Figura 18. Resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs com anião aminoácido.

Comparando os resultados pelo método do complexo amido-iodo dos ILs dos aminoácidos (ChAla e ChGli), estes coincidem com os resultados pelo DNS. Já os resultados das soluções de aminoácidos variam muito quando fazemos a comparação entre os dois métodos. Analisando os resultados e os métodos utilizados, uma explicação para a diferença dos resultados entre os dois métodos para a Alanina e Glicina pode ser o facto de que o DNS apenas quantifica a quantidade de maltose formada enquanto o do complexo amido-iodo quantifica a quantidade de amido gasto. Assim, os resultados indicam-nos que existe consumo de amido (cerca de 100% de actividade pelo método do complexo amido-iodo) e não existe produção de maltose (0% de actividade pelo método do DNS). Isto pode-se dever ao simples facto de que não há produção maltose, mas sim de outros produtos o que viabiliza os resultados obtidos pelos dois métodos.

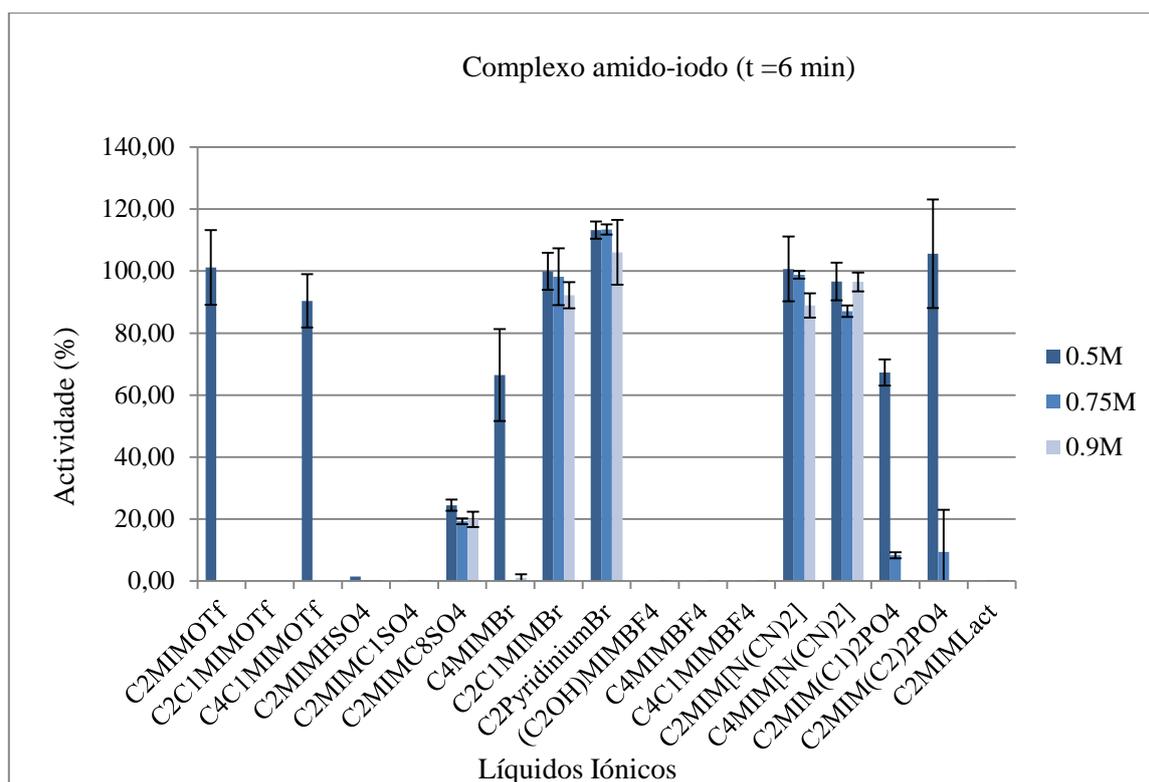


Figura 19. Resultados pelo método do complexo amido-iodo de outros ILs.

Outros ILs de diferentes “famílias” também foram testados por este método. O que se torna notório no gráfico da **Figura 19** é que para além dos ILs que possuem actividade superior a 80% e os que não possuem actividade, existem ILs (C₂MIMOTf, C₄C₁MIMOTf, C₄MIMBr, C₂MIM(C₁)₂PO₄ e C₂MIM(C₂)₂PO₄) para os quais, dependendo da concentração de IL que foi usada, se verifica que a actividade da enzima varia muito. É interessante reparar que quanto maior a concentração de IL, menor a actividade, o que comprova que efectivamente o IL que interfere com a enzima, mostrando, por outro lado, a importância de se testarem concentrações diferentes.

Os resultados obtidos para os ILs C₂MIMLact, C₂MIM(C₁)₂PO₄ (0.9 M), C₂MIMC₈SO₄, C₂C₁MIMOTf e C₂MIMOTf (0.75 M e 0.9 M) contrariam o que seria expectável e precisam portanto de ser revistos e encontrada uma explicação plausível para este comportamento.

Conclusão

Estes estudos permitiram identificar combinações de catiões e aniões que reduzem a actividade da α -amilase e outros que a melhoram em relação à actividade considerada de referência que é a obtido em solução aquosa. O IL que melhor resultado apresenta é o C₂MIMAc atingindo um valor de actividade 20% acima do da água. Ao contrário do obtido anteriormente para as lípases, os ILs baseados em aminoácidos não se revelaram promissores. Os próximos passos incluem o desenho de novos ILs possam ainda melhorar estes resultados, nomeadamente com a utilização de outros aminoácidos.

4.2. Capítulo 2: Estrutura e estabilidade enzimática

4.2.1. FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier)

A utilização da técnica FTIR é muito importante para tentar perceber como é que alguns ILs afectam a estrutura tridimensional da enzima de modo a fazê-la perder a sua actividade catalítica. Quando uma enzima perde a sua actividade é porque sofreu alguma alteração externa na sua estrutura tridimensional, capaz de alterar o centro activo desta.

Assim, utilizando o FT-IR analisaram-se amostras contendo a enzima na presença e na ausência de IL para tentar verificar alguma alteração na sua estrutura secundária (α -hélice e folha- β). As amostras utilizadas tinham como constituinte um IL que provocava a perda da actividade na enzima (testando cada uma das concentrações 0.5, 0.75 e 0.9 M), bem como a enzima na diluição de 4×10^4 . Foram também feitos os respectivos brancos da enzima na diluição de 4×10^4 , do IL em cada uma das diferentes concentrações e da água.

Resultados

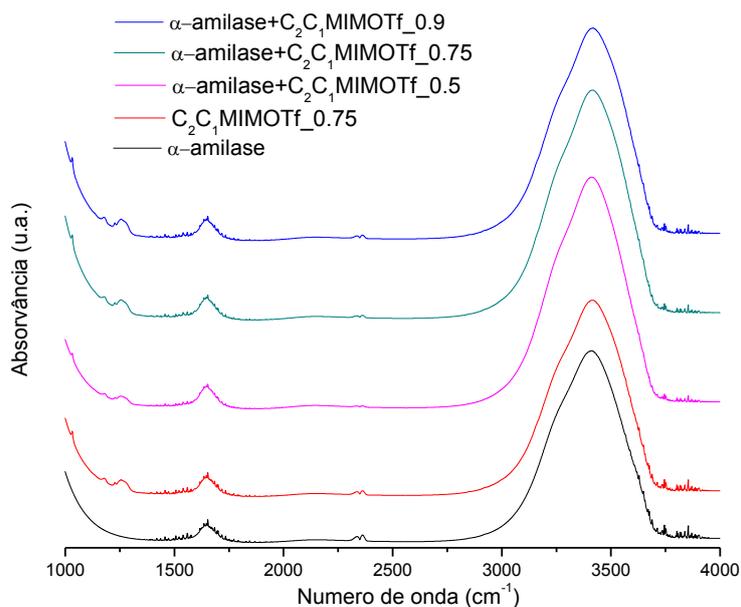


Figura 20. Espectros de FTIR do IL C₂C₁MIMOTf com a enzima.

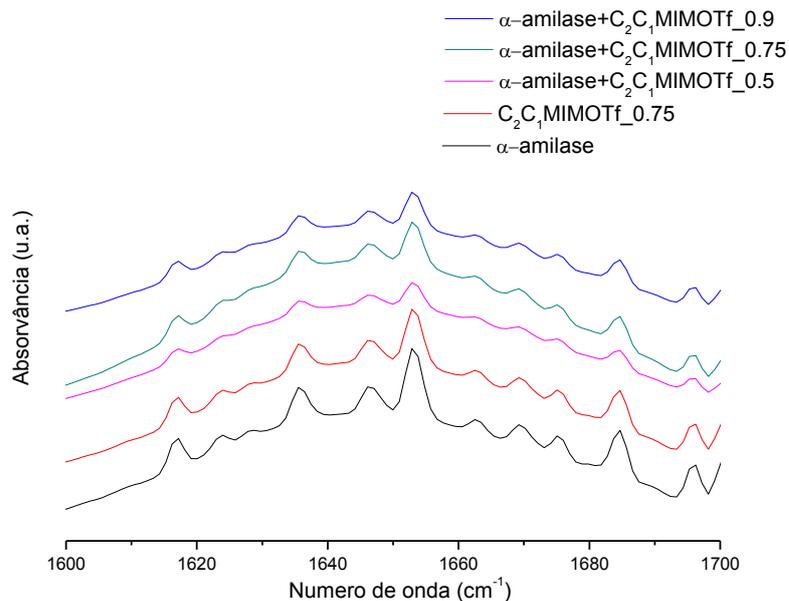


Figura 21. Ampliação dos espectros de FTIR do IL C₂C₁MIMOTf com a enzima na zona onde se encontram as bandas a analisar da estrutura secundária.

Tendo como base trabalhos prévios (Elkins, 2011), (Paquet, Laviolette, Pézolet, & Auger, 2001) e (Ganin, Chung, Smith, Deflores, Jones, & Tokmakoff, 2008) verifica-se que as bandas a analisar correspondentes à α -hélice estão entre 1660-1640 cm^{-1} e à folha- β situam-se entre 1642-1620 cm^{-1} , $\pm 1680 \text{ cm}^{-1}$. Assim analisando a **Figura 21** é possível verificar que não existe aparecimento nem desaparecimento de bandas quando comparamos os espectros das amostras (α -amilase + C₂C₁MIMOTf) com o do IL ou da α -amilase. Quando se tentou fazer a subtração da água por causa da banda de deformação que esta apresenta a 1640 cm^{-1} , verifica-se que ao se fazer a subtração esta apresenta picos invertidos e por vezes valores negativos, o que se conclui estar errado. Tal facto pode ficar a dever-se à necessidade de otimizar as condições do ensaio, nomeadamente através da utilização de distintos espaçadores na célula ou diferentes concentrações.

Com base nos resultados anteriores, tentou-se repetir a experiência, mas em que desta vez foram utilizados tanto a enzima como o IL puros numa razão de volume (por exemplo, 25% do volume da amostra de enzima e 75% do volume da amostra de IL), para diminuir a quantidade de água presente na amostra. Esta repetição da experiência foi uma tentativa de diminuir os picos que indicam a presença de água, a fim de se tentar ver os picos correspondentes α -hélice e à folha- β . A gama do espectro também foi alargada de 4000 cm^{-1} a

500 cm^{-1} para verificar se existia alguma alteração em alguma região do espectro que não nas previstas para a α -hélice e à folha- β .

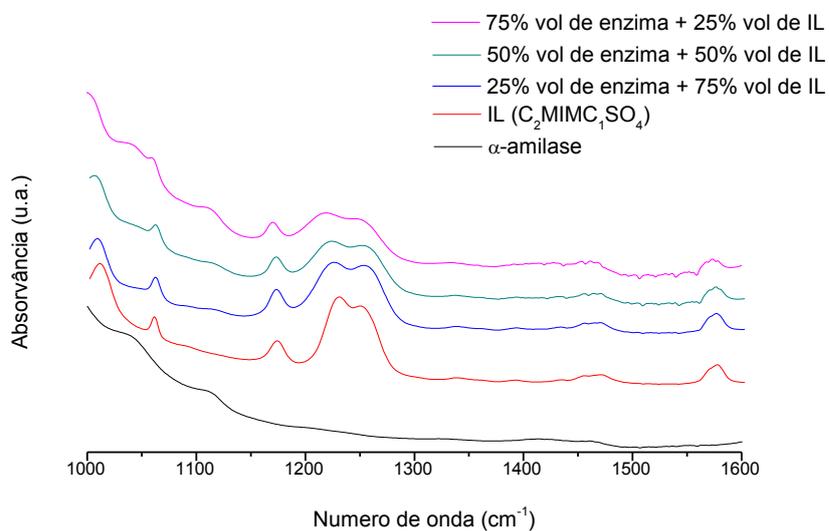


Figura 22. Espectros do IL-C₂MIMC₁SO₄ de 1000-1600 cm⁻¹.

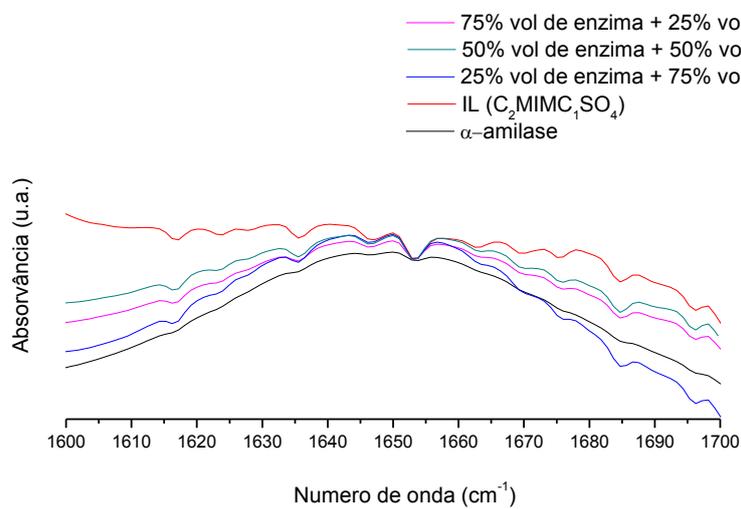


Figura 23. Espectros do IL-C₂MIMC₁SO₄ na zona da amida I.

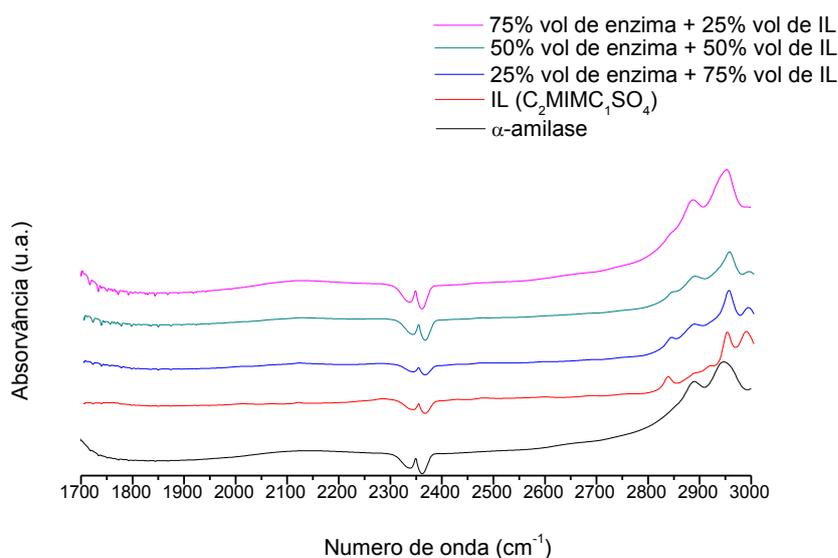


Figura 24. Espectros do IL- $C_2MIMC_1SO_4$ de 1700-3000 cm^{-1} .

Como é possível verificar através das **Figuras 22 a 24** os espectros das amostras (IL+enzima) resultam de uma sobreposição do espectro do branco do IL com o espectro do branco de enzima, não revelando o aparecimento de nenhuma banda nova.

Conclusão

Com base somente nestes dados torna-se difícil de explicar como o IL interfere com a enzima. Se por um lado sabemos com base nos resultados de DNS e do complexo amido-iodo que o IL interfere com a enzima a ponto de a impedir a sua actividade catalítica, os dados do FTIR parecem indicar que essa perda da actividade não se deve a alterações na estrutura secundária (α -hélice e à folha- β) da enzima. Assim, a resposta mais lógica passaria por afirmar que a perda de actividade se deve a um bloqueio do centro activo da enzima pelo IL ou pela alteração da estrutura terciária da enzima. Contudo, não existem evidências reais para estas afirmações, pelo que será necessário continuar com os estudos para explicar o fenómeno de desactivação por alguns líquidos iónicos e a melhoria da actividade por outros.

Esta primeira análise do FTIR foi feita para se verificar se existia alguma diferença visível nos espectros para que depois estes pudessem ser tratados recorrendo a outro método de análise denominado correlação bidimensional (2D). A análise de espectroscopia correlação bidimensional (2D) de FT-IR (Fernandes, et al., 2011) é uma técnica que nos pode dar informação muito útil acerca de como uma determinada variável afecta um sistema. A variável que seria tida em consideração neste caso seria a concentração do IL, uma vez que foram utilizadas três concentrações, (0.5, 0.75 e 0.9 M). Assim, através desta técnica seria possível ver como a concentração do IL afecta a enzima, mais concretamente a nível da estrutura secundária, como por exemplo se o aumento do IL aumenta mais a quebra das ligações da α -hélice ou da folha- β , se aumentam na mesma proporção, se só aumenta uma e a outra permanece constante.

Como numa primeira análise dos espectros do FT-IR não foi possível verificar nenhum tipo de alterações, não foi feito o estudo análise de espectroscopia correlação 2D de FT-IR.

4.2.2. Fluorimetria diferencial de varrimento (DSF)

A fluorimetria diferencial de varrimento é uma técnica que permite identificar a temperatura do ponto médio da desnaturação térmica (T_m) temperatura à qual a concentração de proteína no estado nativo e desnaturado é igual. Este estudo é muito importante, pois a estrutura e o potencial biocatalítico das proteínas está intimamente ligado com o grau de dobramento de proteínas, sendo que é interessante verificar como os ILs afectam a enzima, através da análise do T_m .

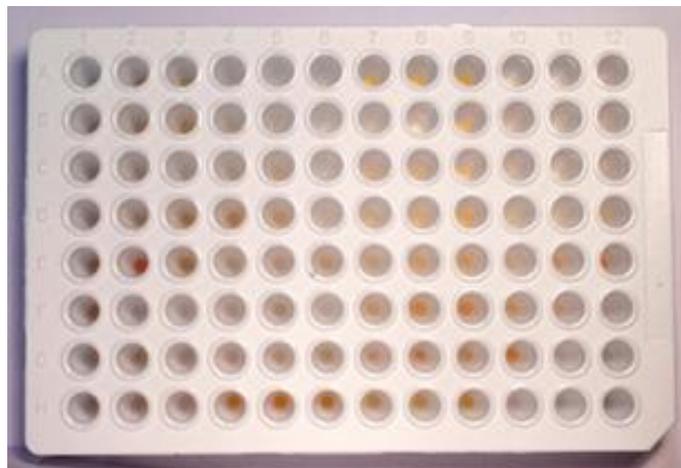


Figura 25. Placa de ensaio do DSF.

Os ILs testados foram seleccionados a partir de ILs comerciais e sintetizados em laboratório, tendo-se escolhido os que tinham conduzido aos resultados mais pertinentes dos métodos anteriores.

Tabela 4. Lista de líquidos iônicos utilizados no DSF.

| Líquidos iônicos comerciais | Líquidos iônicos sintetizados |
|--|---|
| ChCl | ChC ₁ SO ₃ |
| C ₂ MIMCl | C ₃ ChC ₁ SO ₃ |
| C ₄ MIMCl | C ₅ ChC ₁ SO ₃ |
| Benzyl MIMCl | C ₂ ChOAc |
| C ₂ C ₁ MIMBr | C ₃ ChOAc |
| C ₂ PyridiniumBr | ChAla |
| C ₂ MIM(C ₁) ₂ PO ₄ | ChGli |
| C ₂ MIM(C ₂) ₂ PO ₄ | |
| C ₂ MIM[N(CN) ₂] | |
| C ₄ MIM[N(CN) ₂] | |
| C ₂ C ₁ MIMBF ₄ | |

Resultados

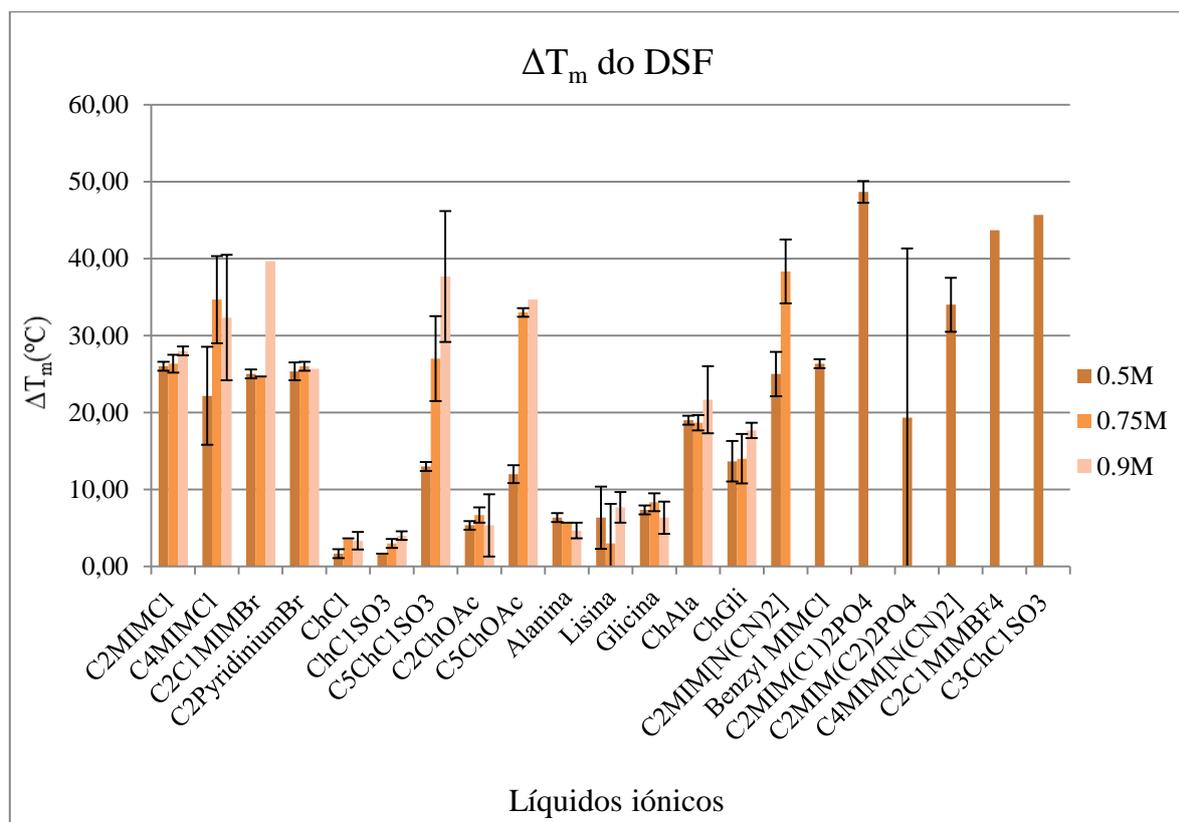


Figura 26. Efeito dos ILs na estabilidade da α -amilase (T_m). ΔT_m corresponde à diferença entre o T_m da enzima em solução aquosa e em solução de IL.

A **Figura 26** apresenta o efeito dos ILs na estabilidade da α -amilase (T_m), sendo que o ΔT_m corresponde à diferença entre o T_m da enzima em solução aquosa e em solução de IL. Assim, os ILs que destabilizam menos a enzima são aqueles para os quais o valor de ΔT_m é mais baixo. Como controlo foram efectuados ensaios de estabilidade térmica da enzima em soluções dos aminoácidos correspondentes aos iões dos ILs.

Conclusão

Os dados obtidos mostram que a estabilidade da enzima em solução de IL é sempre menor que a registada em solução aquosa. Para além disso é possível verificar uma relação entre a variação da estabilidade da enzima e a sua variação de actividade. Como exemplo, para o ChCl, a variação de T_m é muito pequena e o efeito na actividade da enzima é também muito pequeno.

4.3. Capítulo 3: Extracção de enzimas

4.3.1. Sistema bifásico aquoso (ABS)

A utilização de metodologias de extracção baseadas na obtenção de sistemas aquosos bifásicos (ABS) é um método biocompatível que tem sido utilizado para a purificação de enzimas. Para promover a separação das duas fases aquosas é necessário utilizar um sal inorgânico. A escolha recaiu no fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4) por ser um dos mais utilizados no ABS com ILs. (Shahriari, et al., 2013).

O IL escolhido foi o $ChCl$ por ter sido considerado o melhor IL para a actividade da enzima e por ter o ΔT_m mais baixo.

Resultados

Depois de realizar todo o procedimento experimental conducente à obtenção de duas fases aquosas (**Figura 27**), foi necessário quantificar a enzima presente em cada uma das fases. Para tal, começou por utilizar-se o método amido-iodo. Contudo, na última etapa do método do complexo amido-iodo aquando a adição do iodo na cuvete que continha a amostra, esta perdia a cor totalmente, passando a solução a ser incolor. Assim verificou-se que devido ao sal inorgânico que estava presente na fase que continha a enzima não era possível utilizar o método do complexo amido-iodo para medir a actividade da enzima extraída.

Recorreu-se igualmente à utilização do método do DNS, mas quando se efectuou um teste em que se colocou uma amostra da fase que continha a enzima e o sal (K_3PO_4) juntamente com solução de substrato e *color reagent solution* durante 6 minutos, não se verificou a alteração da cor que seria esperada, indicando que também este método não funciona.



Figura 27. ABS do ChCl com a enzima e com o K₃PO₄.

Neste momento, o próximo passo passará pelo desenvolvimento de um método analítico que permita a identificação da distribuição de enzima pelas duas fases e posterior otimização da separação utilizando outros sais/condições experimentais.

Conclusão

A formação de sistemas aquosos bifásicos revelou-se relativamente simples, contudo, para poder medir a partição de enzima pelas fases é necessário um método de medida mais adequado. Para além disso o sal utilizado na formação de ABS tem de possuir três características: não inactivar a enzima, promover a separação das fases e não interferir com o método de medição da actividade. Foram testados outros sais como o cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na₂SO₄), carbonato de sódio (Na₂CO₃), cloreto de cálcio (CaCl₂) e sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄), mas nenhum satisfazia as 3 características acima referidas.

5. Considerações finais

5.1. Resumo

DNS e Complexo amido-iodo

Tabela 5. Comparação dos resultados de DNS e do Complexo amido-iodo (em percentagem aproximadas).

| Líquidos iónicos | DNS | Complexo Amido-iodo |
|--|---------------|--|
| ChCl | 105 % | 110 % |
| C ₂ MIMCl | Não efectuado | 100 % |
| C ₄ MIMCl | 95 % | 105 % |
| C ₆ MIMCl | 85 % | 85 % |
| C ₈ MIMCl | 65 % | 30 % |
| C ₁₀ MIMCl | 35 % | Não efectuado |
| (C ₂ OH)MIMCl | 95 % | 105 % |
| Benzyl MIMCl | 90 % | 100 % |
| C ₂ MIMOTf | 8 % | % muito diferentes entre concentrações |
| C ₂ C ₁ MIMOTf | 5 % | 0 % |
| C ₄ C ₁ MIMOTf | Não efectuado | % muito diferentes entre concentrações |
| C ₂ MIMHSO ₄ | 0 % | 0 % |
| C ₂ MIMC ₁ SO ₄ | 0 % | 0 % |
| C ₂ MIMC ₈ SO ₄ | 75 % | 20 % |
| C ₂ MIMOAc | Não efectuado | 115 % |
| C ₄ MIMBr | 0 % | % muito diferentes entre concentrações |
| C ₂ C ₁ MIMBr | 100 % | 95 % |
| C ₂ PyridiniumBr | Não efectuado | 110 % |
| (C ₂ OH)MIMBF ₄ | Não efectuado | 0 % |

| | | |
|--|---------------|--|
| C ₄ MIMBF ₄ | Não efectuado | 0 % |
| C ₄ C ₁ MIMBF ₄ | Não efectuado | 0 % |
| C ₂ MIM[N(CN) ₂] | 80 % | 95 % |
| C ₄ MIM[N(CN) ₂] | 80 % | 90 % |
| C ₂ MIM(C ₁) ₂ PO ₄ | 45 % | % muito diferentes entre concentrações |
| C ₂ MIM(C ₂) ₂ PO ₄ | 15 % | % muito diferentes entre concentrações |
| C ₂ MIMLact | 90 % | 0 % |
| ChAla | 3 % | 0 % |
| ChGli | 3 % | 0 % |
| ChOAc | 95 % | 90 % |
| C ₂ ChOAc | 98 % | 105 % |
| C ₃ ChOAc | 90 % | 95 % |
| C ₄ ChOAc | Não efectuado | 95 % |
| C ₅ ChOAc | 100 % | 100 % |
| ChC ₁ SO ₃ | 90 % | 105 % |
| ChC ₂ SO ₃ | 90 % | Não efectuado |
| C ₂ ChC ₁ SO ₃ | 5 % | Não efectuado |
| C ₃ ChC ₁ SO ₃ | 8 % | 10 % |
| C ₄ ChC ₁ SO ₃ | 3 % | Não efectuado |
| C ₅ ChC ₁ SO ₃ | 90 % | 95 % |
| C ₂ MIMC ₁ SO ₃ | Não efectuado | 115 % |
| C ₂ MIMC ₂ SO ₃ | Não efectuado | 110 % |
| C ₂ MIMC ₄ SO ₃ | Não efectuado | 100 % |

Na **Tabela 5** é possível comparar os resultados de DNS com os do complexo amido-iodo. Na generalidade ambos os métodos indicam a mesma conclusão, no que diz respeito ao IL interferir positivamente ou negativamente na actividade. Existem dois tipos de resultados divergentes: a) consumo do amido e não formação de maltose, que pode ser explicado pela formação de diferentes produtos de degradação do amido e b) degradação quase nula do amido mas formação de maltose, que necessita de investigação para perceber se este resultado não corresponde a uma interferência dos ILs no método de medida.

DSF

Tabela 6. Resultados do DSF (em valores aproximados).

| Líquidos iônicos | DSF (ΔT_m em °C) |
|--|---------------------------------|
| ChCl | 2 °C |
| C ₂ MIMCl | >10 °C |
| C ₄ MIMCl | >10 °C |
| Benzyl MIMCl | >10 °C |
| C ₂ C ₁ MIMBF ₄ | >10 °C |
| C ₂ C ₁ MIMBr | >10 °C |
| C ₂ PyridiniumBr | >10 °C |
| C ₂ MIM[N(CN) ₂] | >10 °C |
| C ₄ MIM[N(CN) ₂] | >10 °C |
| C ₂ MIM(C ₁) ₂ PO ₄ | >10 °C |
| C ₂ MIM(C ₂) ₂ PO ₄ | >10 °C |
| ChGli | >10 °C |
| ChAla | >10 °C |
| C ₂ ChOAc | 5 °C |
| C ₅ ChOAc | 3 °C |
| ChC ₁ SO ₃ | >10 °C |
| C ₃ ChC ₁ SO ₃ | >10 °C |
| C ₅ ChC ₁ SO ₃ | >10 °C |

Com base nos resultados da **Tabela 6** é fácil concluir que o ChCl é o IL que menos “interfere” na estrutura da enzima.

ABS e FTIR

Com base nos resultados apresentados nas *Tabelas 5 e 6* é possível justificar a escolha do ChCl (alta actividade enzimática e baixa variação no T_m) para os estudos de ABS e a escolha do $C_2C_1MIMOTf$ e $C_2MIMC_1SO_4$ para os ensaios de FT-IR (baixa actividade catalítica).

Apesar de se ter conseguido obter a formação de sistemas aquosos bifásicos com quase todos os sais testados (cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na_2SO_4), carbonato de sódio (Na_2CO_3), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e sulfato de amónio ($(NH_4)_2SO_4$) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4)), a interferência do sal inorgânico com os dois métodos de medida da actividade catalítica utilizados impediu a quantificação da partição da enzima pelas duas fases aquosas.

Todos os ensaios de FT-IR realizados não revelaram qualquer alteração na estrutura secundária da enzima. Em alguns casos a banda da água poderia mascarar alguns resultados, contudo o teste com IL puro também não apresentou qualquer alteração. Deste modo, deverão ser optimizadas as condições de operação do FT-IR disponível de modo a confirmar estes resultados. Caso se confirmem, novas experiências devem ser planeadas para perceber se o IL está a bloquear o centro activo da enzima. Esta seria uma explicação plausível para os resultados que obtivemos tendo em conta que existe desactivação da enzima, mas sem alteração da sua estrutura secundária.

5.2. Conclusões

O trabalho realizado permitiu identificar os ILs mais promissores para uma possível utilização como solventes em biocatálise. Para além disso, permitirá o desenho de novos ILs que potenciem a eficiência na estabilidade e actividade enzimática da α -amilase.

Os melhores exemplos estudados são a ChCl e o C₂MIMOAc que apresentam uma actividade superior àquela obtida em solução aquosa, sem comprometer a estabilidade da enzima. De uma forma geral a actividade e estabilidade da enzima diminuem com o aumento das cadeias alquílicas ligadas ao catião e com o aumento da concentração de IL.

Os estudos de separação da enzima utilizando a formação de sistemas aquosos bifásicos foram bastante promissores, contudo não foi possível, com os métodos de quantificação da actividade utilizados, inferir qual a partição da enzima pelas duas fases. Uma nova metodologia deverá ser implementada de modo a obter esta informação.

No ABS não foi possível encontrar um sal que reunisse as três características necessárias (não interferir com a enzima, não interferir com o método de medição da actividade e efectuar a separação de fases), mas visto que na bibliografia não existe praticamente nada sobre o ABS para a α -amilase (mais concretamente para esta enzima em específico) o presente trabalho representa um estudo que serviu para identificar o problema e colocar de parte alguns dos sais mais utilizados no ABS, que não se mostraram eficazes para estas condições.

Os ensaios de FT-IR mostram resultados interessantes, contudo a necessitar confirmação. Os indícios apontam para uma desactivação da enzima por bloqueio do centro activo desta sem alteração na sua estrutura secundária.

O trabalho realizado é de extrema importância para o desenho de novas tecnologias limpas para utilização em biocatálise. A criação de conhecimento ao nível fundamental sobre as interacções que promovem o aumento da actividade enzimática em soluções de ILs poderá no futuro abrir novas opções ao nível das formulações de ILs que se tornem efectivamente opções viáveis para aplicação industrial. A elevada multidisciplinaridade de um projecto como este torna necessário um esforço concertado de várias equipas com distintas especialidades.

6. Bibliografia

Referências Bibliográficas

- Bradford, M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Dabirmanesh, B., Daneshjou, S., Sepahi, A., Ranjbar, B., Khavari-Nejad, R., Gill, P., et al. (2011). *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, pp. 93-97.
- Deive, F., Rodríguez, A., Pereiro, A., Araújo, J., Longo, M., Coelho, M., et al. (2011). *Green Chem.*, 13, p. 390.
- Deive, F., Ruivo, D., Rodrigues, J., Gomes, C., Sanromán, M., Rebelo, L., et al. (a ser submetido). On the hunt of hydrophilic ionic liquids able to activate lipases.
- Delatorres, A. B., Ladeira, S. A., Andrade, M. V., Barbosa, J. B., & Martins, M. L. (2010). *Perspectiva online*, 4, 132-145.
- Elkins, K. (2011). *J. Forensic. Sci.*, 56, 6.
- Fernandes, M., Nobre, S., Qinghong, X., Carcel, C., Cachia, J., Cattoën, X., et al. (2011). *J. Phys. Chem. B*, 115, 10877.
- Fruton, J. S., & Simmonds, S. (1958). *General Biochemistry*. New York: Wiley International Edition.
- Ganin, Z., Chung, H., Smith, A., Deflores, L., Jones, K., & Tokmakoff, A. (2008). *Accounts of chemical Research*, 42, p. 432.
- Kragl, U., Eckstein, M., & Kaftzik, N. (2002). *Chemical Biotechnology*, 13, pp. 565-571.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretschauer, A., et al. (2007). *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Moninuzzaman, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). *Org. Biomol. Chem.*, 8, pp. 2887-2899.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Lehninger, Principios de Bioquímica* (3ª edição ed.). São Paulo: Editora Sarvier.
- Paquet, M.-J., Laviolette, M., Pézolet, M., & Auger, M. (2001). *Biophysical Journal*, 81, p. 305.

- Petkovic, M., Ferguson, J., Nimal Gumarate, H. Q., Ferreira, R., Leitão, M. C., Seddon, K. R., et al. (2010). *Green Chem.*, *12*, pp. 643-649.
- Petkovic, M., Seddon, K. R., Rebelo, L. P., & Pereira, C. S. (2011). *Chem. Soc.Rev.*, *40*, p. 1383.
- Plechkova, N., & Seddon, K. (2008). *Chemical Society Reviews*, *37*, 123-150.
- Ribeiro, E., Silva, J. C., & Oliveira, Ó. (2005). *Biodesafios*. Lisboa: Edições ASA.
- Rodrigues, J., Prosinecki, V., Marrucho, I., Rebelo, L., & Gomes, C. (2011). *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *13*, pp. 13614-13616.
- Shahriari, S., Tomé, L., Araújo, J., Rebelo, L., Coutinho, J., Marrucho, I., et al. (2013). *RSC Adv.*, *3*, pp. 1835-1843.
- Sigma-Aldrich*. (s.d.). Obtido em 20 de Setembro de 2012, de <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>
- Spier, M. R. (2005). *Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -Amilase e Amiloglucosidase Por Fermentação No Estado Sólido*. Dissertação de Mestrado, Curitiba: Universidade Federal do Paraná).
- Tavares, A., Rodrigues, O., & Macedo, E. (2010). In *InTech*.
- Ventura, S., Barros, R., Barbosa, J., Soares, C., Lima, A., & Coutinho, A. (2012). *Green Chem.*, *14*, p. 734.
- Ventura, S., Sousa, S., Freire, M., Serafim, L., Lima, A., & Coutinho, J. (2011). *Journal of chromatography B*, *879*, pp. 2679-2687.
- Young, J. Y., Hong, Y. J., & Hatch, R. T. (1987). *Biotechnology and Bioengineering*, *30*, pp. 147-151.