

Em países europeus e nos Estados Unidos esses eletrodos são usados em medidas contínuas de glicose, lactato, uréia, ácido úrico, em laboratórios de emergência e monitoramento de pacientes de unidades de terapia intensiva.

Acredita-se que a probabilidade de um biossensor enzimático tornar-se bem estabelecido no mercado dependerá da sua relevância industrial e sobretudo da sua praticabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; "Enzyme, Microbial and Immunochemical Electrodes Probes" in "Enzymes and Immobilised Cells in Biotechnology"; Allen I. Laskin, Ed.; The Benjamin/Cummings Publ. Comp., California (1985).
- <sup>2</sup> Wingard Jr., L.B.; "Electrochemical Techniques with Immobilised Biological Materials", in "Immobilised cells and enzymes, a practical approach", Woodward Ed., IRL Press, Oxford (1985).
- <sup>3</sup> Kulys, J.J.; *Biosensors*, (1986), 2, 3.
- <sup>4</sup> Guilbault, G.G.; "Analytical uses of immobilized enzymes", Marcel Dekker, Inc, New York (1984).
- <sup>5</sup> Clark, L.C.; Lyons, C.; *Ann. N.Y. Acad. Sci* (1962), 102, 29.
- <sup>6</sup> Coulet, P.R.; Gautheron, D.C.; Bertrand, C.; *Anal. Chim. Acta* (1981), 126, 23.
- <sup>7</sup> Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* (1986), 181, 219.
- <sup>8</sup> Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Chem.* (1986), 58, 523.
- <sup>9</sup> Tschida, T.; Yoda, K.; *Enzyme Microbiol. Technol.* (1981), 3, 326.
- <sup>10</sup> Divies, C.; *Chem. Eng. News*, (1976), 54, 23.
- <sup>11</sup> Suzuki, S.; Satoh, I.; Karube, I.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1982), 7, 147.
- <sup>12</sup> Rechnitz, G.; *Science*, (1981), 214, 287.
- <sup>13</sup> Aizawa, M.; Suzuki, S.; *Chem. Lett.* (1977) 7, 779.
- <sup>14</sup> Updike, S.J.; Shults, M.C.; Bushby, M.; *J. Lab. Clin. Med.*, (1979), 93, 518.
- <sup>15</sup> Nagy, G.; Von Storp, L.H.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta* (1973), 66, 443.
- <sup>16</sup> Mascini, M.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1977), 49, 795.
- <sup>17</sup> Schindler, J.G.; Gülich, M.; *Biomed. Technik*, (1981), 26, 43.
- <sup>18</sup> Guilbault, G.G.; Nanjo, M.; *Anal. Chem.* (1974), 73, 367.
- <sup>19</sup> Nanjo, M.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta* (1975), 75, 169.
- <sup>20</sup> Havas, J.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.*, (1982), 54, 1991.
- <sup>21</sup> Guilbault, G.G.; Coulet, P.; *Anal. Chim. Acta*, (1983), 152, 223.
- <sup>22</sup> Matsumoto, K.; Yamada, K.; Osajima, Y.; *Anal. Chem.* (1981), 53, 1974.
- <sup>23</sup> White, W.C.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1978), 50, 1481.
- <sup>24</sup> Coulet, P.R.; Bertrand, C.; *Anal. Lett.* (1979), 12, 581.
- <sup>25</sup> Satoh, I.; Karube, J.; Suzuki, S.; *Biotechnol. Bioeng.* (1976), 18, 269.
- <sup>26</sup> Cheng, F.; Christian, G.; *Clin. Chim. Acta*, (1979), 91, 295.
- <sup>27</sup> Yao, T.; Musha, S.; *Anal. Chim. Acta*, (1979), 110, 203.
- <sup>28</sup> Enfors, S.; Nilsson, H.; *Enzyme Microb. Technol.* (1979) 1, 260.
- <sup>29</sup> Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; Eds.; "Biosensors: Fundamental and Applications"; Oxford University Press, Oxford (1987).

## DIVULGAÇÃO

### MICROCALORIMETRIA BIOLÓGICA – PARTE II – USOS E APLICAÇÕES DA MICROCALOMETRIA NA MONITORAÇÃO E ESTUDO TERMODINÂMICO E ANALÍTICO DE SISTEMAS DE NATUREZA BIOLÓGICA.

Pedro L.O. Volpe

Instituto de Química – UNICAMP; C. Postal 6154; 13083 – Campinas (SP)

Recebido em 4/5/88

## ABSTRACT

It is intention to review biocalorimetrics work. Of the purely thermodynamic studies, only a few representative examples are discussed, whereas more complete coverage is given of the general analytical studies. Microcalorimetric

studies on biological systems and on impure biochemical preparations have their main interest as general analytical experiments. Such applications are presently being developed into what are believed to be important experimental techniques in basic biology, as well as in applied areas like, fermentation, microorganism growing, biological response,

clinical sciences, transfer thermodynamics with model compounds, solvents and with microbial cells, hydrophobic effect, and various fields of biotechnology, biothermodynamics and environmental research.

## INTRODUÇÃO

Entre as técnicas microcalorimétricas, a microcalorimetria de fluxo constitui uma técnica analítica recente e não específica para a caracterização de processos e progressos de crescimento e morte de microorganismos<sup>1-3</sup> e isto tem despertado o interesse de pesquisadores como experimentos analíticos, onde estas aplicações estão sendo desenvolvidas em vários países e tem-se mostrado importante em áreas acadêmicas e práticas.

Por meio desta técnica, o calor produzido por todos os eventos metabólicos que ocorrem num meio de cultura podem ser registrados sem perturbar o processo, por isto a curva  $dQ/dt$  (w) vs. tempo (horas), chamada termograma ou curva p-t (potência-tempo) (IUPAC-IUPAB-IUB, Interunion Commission on Biothermodynamics, 1982), determina "in situ" a medida da atividade biológica de compostos ou associações de compostos, assim como crescimento e atividade de fungos, crescimento de bactérias, processos de fermentação, avaliação de biomassas, testes do potencial de antibióticos<sup>2</sup>, variação de entalpia de transferência de fase em solventes modelos e em microorganismos<sup>4,6</sup> e efeito hidrofóbico.

A produção de calor em experimentos bioquímicos ou biológicos é frequentemente pequena e os métodos microcalorimétricos são de interesse principal nestas áreas.

O fluxo de calor  $dQ/dt$  registrado nos termogramas obtidos, bombeando-se para o microcalorímetro suspensões provenientes de microfermentadores (em condições aeróbicas ou anaeróbicas), fazem também da microcalorimetria uma poderosa ferramenta no estudo da fermentação, uma vez que as investigações calorimétricas de sistemas químicos, bioquímicos e biológicos, em contraste aos métodos espectrofotométricos não requerem objetos opticamente transparentes, mas podem ser usadas em sistemas não transparentes, tais como suspensão de células, tecidos, solos, soluções grosseiras, ou suspensões de compostos bioquímicos.

Todos os processos, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, são acompanhados por uma produção ou absorção de calor. A quantidade de calor está relacionada com a extensão do processo, e o calor desenvolvido para um dado processo é proporcional à intensidade ou à velocidade do processo. É assim claro, que a calorimetria, como já foi dito, em adição a sua importância na pesquisa termodinâmica, também serve como uma ferramenta analítica geral. Aplicações potenciais são encontradas em física, em química e recentemente, especialmente em biotermodinâmica e biotecnologia. Entretanto, foi só recentemente que técnicas calorimétricas começaram a ser adotadas por físico-químicos interessados em sistemas de natureza biológica fora de poucos laboratórios especializados<sup>1,2,5</sup>.

As razões para este aumento de interesse em microcalorimetria biológica são sem dúvida que, técnicas calorimétricas foram muito melhoradas nos últimos anos e que instrumentos apropriados são comercialmente disponíveis. Outra razão é provavelmente também a necessidade de novas técnicas analíticas para serem aplicadas em áreas onde existem poucos ou mesmo métodos analíticos não aceitáveis, como também tem aumentado a necessidade por mais dados termodinâmicos fidedignos.

O fato de que métodos calorimétricos são tão gerais, e dessa maneira não específicos, é uma limitação para muitos tipos de problemas analíticos. Entretanto, em sistemas de natureza biológica, a especificidade inerente dos sistemas de reações frequentemente permite o uso de um método analítico não específico. Deve ser também lembrado que para todas as espécies de processos, mas em particular para muitos processos complexos, por exemplo; fermentação, crescimento de microorganismos, transferência de fase, resposta biológica, etc, é algumas vezes vantajoso usar um método não específico do que um método muito específico para se estudar o sistema. Microcalorimetria como uma técnica analítica tem outra característica a seu favor: ela é essencialmente uma técnica não destrutiva e não requer a adição de grupos cromogênicos para produzir determinadas espécies de absorção como acontece nos métodos espectrais, além do fato de que também oferece o potencial para múltipla análise sequencial num simples volume da amostra.

A escolha do microcalorímetro para finalidades analíticas é devida à sua sensibilidade. Microcalorímetros do tipo batelada requerem um tempo longo de equilíbrio mas são extremamente sensíveis (da ordem de microjoules) o que corresponde a quantidades micromolares de substância. A última geração de microcalorímetros de fluxo são tão sensíveis quanto os do tipo batelada, como é o caso do microcalorímetro LKB - Monitor de Bioatividade, baseado no projeto de Wadsö<sup>7</sup>. A sensibilidade é  $< 1 \mu W$  para uma troca de calor constante (ex.: crescimento de microorganismos) e  $< 1 \mu J$  para uma reação com um pulso de calor (ex.: interação soluto solvente, etc).

Em muitos estudos termoquímicos de processos de natureza biológica (biotermodinâmica), importantes informações analíticas gerais são conseguidas durante a obtenção dos dados termodinâmicos. Deve ser dito que os dados termodinâmicos por si só formam uma espécie de informação analítica a qual, agora ou no futuro poderá ser interpretada em termos de propriedades físicas e químicas dos sistemas aos quais estes dados estão relacionados.

As pesquisas biotermoquímicas estão concentradas em sistemas constituídos por compostos bioquímicos purificados e em compostos modelos. Sistemas biológicos e misturas brutas tais como meios complexos, (extratos, suspensões, preparações biológicas, etc) são pouco definidos do ponto de vista termodinâmico e investigações nestes sistemas dificilmente conduzirão a resultados termodinâmicos que possam ser discutidos num nível molecular da mesma maneira que os determinados para sistemas purificados e compostos modelos. No entanto, alguns pesquisadores<sup>6</sup> realizaram experimentos termodinâmicos com material

vivo ou com sistemas de natureza biológica pouco definida para conhecer melhor a termodinâmica destes sistemas.

No momento, estudos calorimétricos em sistemas biológicos tem seu principal interesse como experimentos analíticos e na monitoração destes processos.

## APLICAÇÕES ANALÍTICAS E REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Em laboratórios clínicos, o teste de enzimas que necessitam o sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como cosubstratos é feito rotineiramente. O sistema de detecção é a mudança de absorção a 340 nm (Figura 1),<sup>11</sup>. Este método fornece também a base para a determinação do nível de vários outros metabólitos.

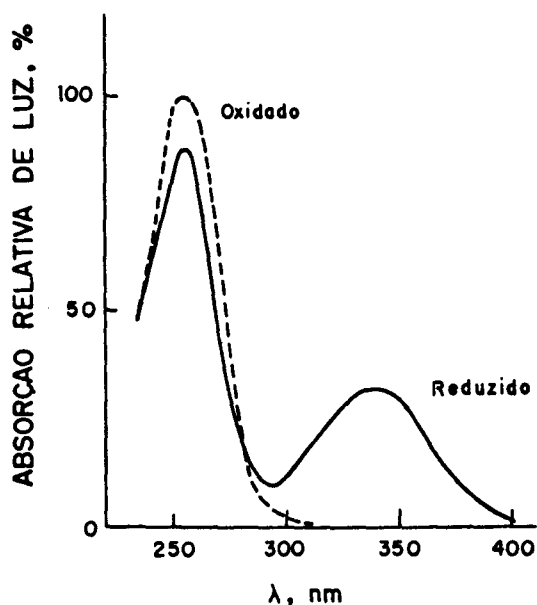
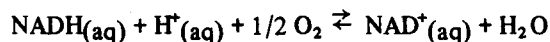


Figura 1 – Espectros de absorção do  $\text{NAD}^+$  e do  $\text{NADH}$ . Ref. (11)

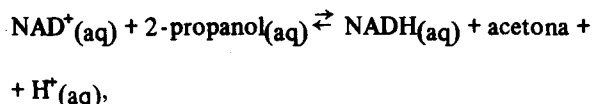
Poe<sup>8,9</sup> mediu calorimetricamente a entalpia da reação:



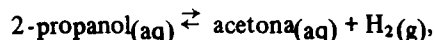
e encontrou  $\Delta H = -258 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A partir dos potenciais de oxidação/redução desta equação<sup>10</sup> calcula-se  $\Delta H = -242 \text{ kJ mol}^{-1}$ , portanto da mesma ordem de grandeza do determinado calorimetricamente. Esta grandeza de calor permitiu se usar a microcalorimetria como uma técnica analítica na detecção de concentrações da ordem de nanomolar da oxidação ou redução dos cofatores  $\text{NAD}(\text{H})$  e  $\text{NADP}(\text{H})$ <sup>1,2</sup>.

Uma determinação precisa do calor de redução do  $\text{NAD}^+$  é um dado importante para a avaliação dos calores de reação redox do  $\text{NAD}$  e  $\text{NADP}$ .

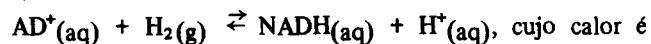
Para muitas das reações bioquímicas envolvendo oxidação, um próton é liberado. Kenneth<sup>12</sup> determinou o calor da reação:



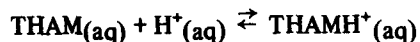
$\Delta H = 42,5 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$  e dos artigos da literatura<sup>13-21</sup> pode-se obter o valor da variação de entalpia para a reação:



$\Delta H = 71,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  a partir destas duas equações, obtemos a variação de entalpia para a reação:



$\Delta H = -29,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ , concordante com o valor obtido calorimetricamente por Poe para a mesma reação<sup>8</sup>. De fato, um próton é liberado nesta reação bioquímica envolvendo oxidação e se um tampão Tris ou THAM (tris-hidroximetilaminometano) estiver presente, sua protonação:



fornecerá um  $\Delta H = -47,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Desde que variações de calor são algebricamente aditivas, a oxidação de  $\text{NADH}$  na presença de um tampão tris dará uma “variação de entalpia efetiva” de  $\Delta H = -76,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Com os modernos microcalorímetros isto permite a detecção de  $\text{NADH}$  oxidado a níveis de concentração de 10 nmol.

Como um princípio geral, em biotermodinâmica, a variação de entalpia pode ser aumentada quando as condições permitem um tampão atuar como um aceitador de prótons (reação de amplificação). Em adição, qualquer reação que resulta na formação de água ( $\Delta H = -56,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) serve também como uma reação de amplificação. Isto se aplicaria para qualquer reação liberando peróxido de hidrogênio como produto da reação, por exemplo para o sistema de enzimas glicose oxidase e uricase, a reação com catalase resulta na formação de água.

Como um exemplo de aplicações analíticas da microcalorimetria, o NBS – National Bureau of Standards, desenvolveu um método microcalorimétrico de determinação de glicose no soro e plasma humano<sup>22</sup>. Neste experimento foi usado um calorímetro de condução de calor de cela de reação simples, do tipo descrito em<sup>23</sup>.

A reação glicose-hexoquinase pode ser medida através da reação:



Nesta reação um próton é liberado e é portanto vantajoso usar um tampão amina como Tris. Resultados dos experimentos de fosforilação da glicose feitos em tampão Tris<sup>24</sup> dão um valor da entalpia de reação  $\Delta H = -61,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A contribuição da reação de protonação do Tris representa cerca de 80% do efeito exotérmico.

Qualquer tentativa de desenvolver um novo método analítico de determinação da glicose implica que este deva ser comparável ou preferencialmente melhor que os procedi-

Tabela 1. Determinação da glicose por microcalorimetria.

Reagentes	Precisão (%)	Intervalo de concentração (µg/ml)	Método	Referências
Glicose oxidase + peroxidase	—	1-40	Fluxo	27
ATP + hexoquinase	2	300-10.000	Entalpietria por injeção	28
ATP + hexoquinase	5	400-3.000	Batelada	29
ATP + hexoquinase (imobilizada dentro do calorímetro)	5	250-2.000	Fluxo	30
Glicose oxidase (imobilizada) + catalase	5	90-180	Fluxo	31

mentos existentes. Portanto, muitos esforços têm sido centrados na determinação da glicose por microcalorimetria. A Tabela 1 resume o trabalho de vários pesquisadores.

Smith e Carr<sup>25</sup> e Carr *et al.*,<sup>26</sup> usaram a microcalorimetria para determinar a concentração de proteína em soros por titulação com ácido fosfotungstíco (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 24WO<sub>3</sub> · 44H<sub>2</sub>O). Embora o calor liberado seja uma função dos ânions que interagiram e os números de sítios aniônicos, os resultados mostram uma excelente correlação dos dados calorimétricos com a determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Uma concentração de proteína de 0,1 a 1,5% pode ser determinada com uma precisão de 0,5%.

A atividade enzimática é normalmente determinada por medidas espectrofotométricas onde se observa o processo:

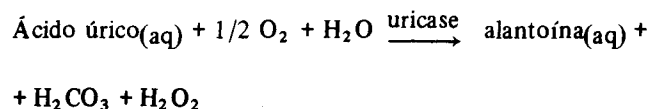
substrato específico → produto da reação

Freqüentemente o processo enzimático primário ocorre junto com outros processos enzimáticos ou não enzimáticos de maneira a se obter a mudança espectral necessária. Não é freqüente o uso de outras técnicas, por exemplo titulação potenciométrica, para se estudar um processo catalisado enzimaticamente. Para muitos dos compostos de interesse em bioquímica e em vários ramos da biologia aplicada às reações enzimáticas específicas podem ser planejadas.

Enzimas imobilizadas dentro de microcalorímetros de fluxo são também usadas para a determinação de substratos<sup>32</sup>. A microcalorimetria de fluxo mostra-se também útil no estudo da hidrólise da uréia pela urease<sup>33</sup>, sendo possível de se determinar uma relação linear entre a atividade enzimática e a resposta do instrumento no intervalo de concentração de 0,25 – 2,0 mg/ml de urease. Este método foi usado para a determinação de uréia em urina.

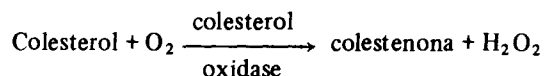
Pouquíssimas reações enzimáticas foram investigadas com o detalhe necessário para permitir uma avaliação dos parâmetros termodinâmicos da reação.

A determinação de ácido úrico no soro utilizando um microcalorímetro foi cuidadosamente desenvolvido por Rehak *et al.*,<sup>34</sup>. A estequiometria da reação enzimática é



$\Delta H = 19,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A concentração normal de ácido úrico no soro é de 20 a 60 mg/l, e para uma amostra que contenha 40 mg/l (236 µM), o calor produzido será de  $4,73 \times 10^{-3}$  joules. A reação foi amplificada colocando catalase que regenera oxigênio pela conversão catalítica do peróxido de hidrogênio rápida e quantitativamente e com uma grande variação de entalpia, elevando a produção de calor para  $-149,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>35</sup>.

A determinação do colesterol pela oxidação deste foi feita por McGuinness *et al.*,<sup>36</sup>. A reação estudada é:



A medida do calor foi feita num microcalorímetro do tipo condução de calor e a entalpia da reação determinada foi de  $\Delta H = -112 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A Tabela 2 mostra algumas reações enzimáticas estudadas calorimetricamente.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANTIBIÓTICOS, ATIVIDADE BIOLÓGICA, RESPOSTA BIOLÓGICA.

O uso de microorganismos como o "reagente" para testar inibidores tais como antibióticos foi sugerido por Prat<sup>42</sup> que mostrou que a resposta biológica da estreptomicina podia ser mostrada e monitorada pela redução do calor produzido (dq/dt vs tempo) no crescimento de uma cultura de *Escherichia coli*.

Beezer *et al.*,<sup>1,2,43,44</sup> desenvolveram um procedimento calorimétrico para o teste de uma ampla variedade de antibióticos e compostos antimicóticos os quais podem ser testados num tempo muito menor (1 h) do que usando o método clássico de difusão em placa de agar-agar (16 h). A re-

Tabela 2. Algumas reações enzimáticas estudadas por microcalorimetria.

Enzimas	Tipo de microcalorímetro	Referências
Acetilcolinesterase	Batelada	37
Aldolase	Batelada	38
Fosfatase alcalina	Fluxo	39
ATPase	Fluxo	39
Glicose oxidase + peroxidase	Fluxo	29
Colinesterase + inibidores	Fluxo	40
Hexoquinase + ATP	Fluxo	30
Urease	Fluxo	33
Glicose oxidase (inibida por $Ag^+$ e $Pb^{2+}$ )	Batelada	41
Ácido Láctico dehidrogenase	Fluxo	39

produtibilidade da técnica microcalorimétrica é de  $\pm 3\%$  comparada com  $\pm 5$  a  $10\%$  para o método de placa. Este método é de fácil operação e também permite a combinação de antibióticos para determinar o efeito de "potenciação". Em adição as considerações analíticas, a forma dos termogramas também indica diferenças no modo de ação dos antibióticos.

Boling *et al.*,<sup>45</sup> estudaram as curvas p-t de crescimento de microorganismos para um grande número de diferentes membros da família *Enterobacteriaceae* e verificou que todos os termogramas eram suficientemente diferentes para servir como uma identificação do tipo "impressão digital". O instrumento usado por este grupo de pesquisadores foi um calorímetro do tipo batelada "batch", um modelo experimental do laboratório de instrumentação, Lexington, Massachusetts.

Foi demonstrado recentemente<sup>1</sup> que métodos calorimétricos podem ser usados para a identificação de bactérias por meio dos complexos mas reprodutíveis termogramas ou curvas p-t obtidos. É portanto possível que a técnica da "impressão digital" sugerida por Boling *et al.*,<sup>45</sup> possa se desenvolver num futuro próximo numa poderosa técnica, numa área como bacteriologia clínica.

Recentemente a microcalorimetria de fluxo foi usada por Beezer *et al.*,<sup>46</sup> para determinar a resposta biológica, RB, de m-alcoixifenois e p-hidroxibenzoatos com *Escherichia coli*. Os dados da resposta biológica são muito importantes nos estudos de QSAR, "relação de atividade - estrutura" usada na pesquisa farmacêutica onde a estrutura do composto está relacionada com a RB e com a solubilidade na biofase. Análise destes dados permitiram a identificação da contribuição da "estrutura pai" (a molécula menos os grupos  $n-CH_2$  presentes na cadeia lateral) e os grupos lipofílicos  $CH_2$ .

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA

O uso de métodos microcalorimétricos para se ter uma avaliação da atividade microbiana está no momento sendo

explorado em várias áreas. Deve ser dito que o problema é complexo, mas que os microcalorímetros são uma ferramenta geral (não específica) e que pode ser desenvolvida em diversas áreas práticas como ecologia, agricultura, biotecnologia e microbiologia clínica. Mortensen *et al.*,<sup>47</sup> publicaram um estudo microcalorimétrico da atividade microbiana em solo e como isto é afetado por diferentes tratamentos da amostra do solo. O resultado deste experimento mostrou que a adição de uma mistura de sais;  $NaNO_3$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$ , não afeta significativamente a produção de calor, enquanto que no caso da adição de celulose, o efeito térmico aumenta após um período de incubação de 10 dias. Com a combinação da mistura de sais e celulose o efeito térmico aumenta consideravelmente após um período de 3 dias. Deve ser enfatizado que estes dados refletem além da composição dos fertilizantes utilizados, a resposta dos microorganismos contidos na amostra do solo. Experimentos deste tipo estão sendo desenvolvidos para serem aplicados na agricultura, na pesquisa da poluição e para testes de rotina no estudo da poluição.

A avaliação de bactérias em leite estocado foi feita por Cliffe *et al.*,<sup>48</sup> usando um microcalorímetro de fluxo LKB. Estes pesquisadores encontraram uma boa correlação entre a medida do efeito térmico, a contagem viável e o tempo necessário para a redução do azul de metileno. Beezer *et al.*,<sup>49</sup> fizeram a determinação de bactérias em urina usando um microcalorímetro de fluxo.

## MONITORAÇÃO DO PROCESSO DE CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS E PROCESSOS FERMENTATIVOS

Microcalorimetria de fluxo é uma técnica fundamental para monitorar o processo de crescimento de microorganismos e pode ser usada em sistemas aeróbicos e anaeróbicos, pois o calor produzido por todos os eventos metabólicos que ocorrem num meio de cultura, pode ser registrado sem perturbar o processo e desta maneira, a curva p-t é o registro ou monitoração "in situ". Nestes experimentos usa-se uma cela de reação de fluxo contínuo e a suspensão aerada é bombeada por meio de uma bomba peristáltica para a cela de reação. O microcalorímetro usado é o do tipo descrito em<sup>23</sup>. Vários exemplos deste tipo de pesquisa estão contidos em<sup>1</sup>.

Experimentos de crescimento com *Escherichia coli* em condições aeróbicas foram feitos por Wadsö *et al.*,<sup>50</sup> e os termogramas obtidos representam um registro muito mais detalhado do processo de crescimento, do que os obtidos por turbidimetria.

Monk<sup>51</sup> estudou as curvas de crescimento de três variedades de *Streptococci* e para *Escherichia coli* aeróbica e anaerobicamente. Os termogramas foram obtidos usando um microcalorímetro do tipo descrito em<sup>23</sup> e cela de passagem de fluxo "flow through". As condições aeróbicas na cela de reação do microcalorímetro foram mantidas recirculando a suspensão de células, até o vaso de crescimento aerado. Anaerobiose foi obtida interrompendo o fluxo quando a cela de fluxo estava cheia com a suspensão de células. A construção da cela de fluxo é impermeável ao

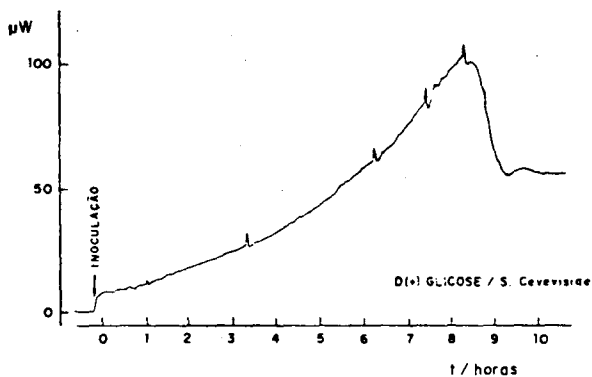


Figura 2 – Curva p-t do crescimento anaeróbico de *Sacharomyces cerevisiae* em solução de D (+) glicose.

oxigênio e os microorganismos criaram rapidamente condições anaeróbicas.

Em trabalho recente, Volpe<sup>52</sup> monitorou sistematicamente o crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* em condições anaeróbicas (atmosfera de N<sub>2</sub>) em soluções de vários açúcares (sacarose, glicose, frutose, manose, maltose, galactose, ribose, etc.) e combinações destes açúcares, utilizando um microcalorímetro multicanal LKB – Monitor Biológico<sup>7</sup>. Este trabalho foi desenvolvido para monitorar o crescimento e tempo de exaustão dos diferentes açúcares, assim como uma primeira tentativa de se usar a microcalorimetria de fluxo no estudo da seletividade de microorganismos em contato com combinações de diferentes açúcares. As figuras 2 e 3 mostram algumas das curvas de crescimento anaeróbico da *Sacharomyces cerevisiae*. Neste trabalho foi também, paralelamente à produção de calor, monitorado a formação de álcool por cromatografia gasosa.

## BIOTERMODINÂMICA

Em geral é muito difícil interpretar os valores das propriedades termodinâmicas obtidas para um sistema bioquí-

mico. Entretanto, uma aproximação útil para o melhor entendimento dos dados biotermodinâmicos é estudar modelos bioquímicos simples. Uma área importante no estudo de modelos é a que trata das interações entre água e outros solventes e solutos, incluindo as propriedades de transferência de compostos e grupos entre diferentes meios. Tais processos de transferência contribuem substancialmente para a termodinâmica de muitos processos bioquímicos.

Estudos calorimétricos de compostos modelos foram feitos por Suurkuusk<sup>53</sup>. Neste estudo a medida precisa da capacidade calorífica foram obtidas para lisozima, quimotripsinogênio e ovoalbumina no estado sólido e em soluções aquosas diluídas, utilizando um microcalorímetro LKB<sup>54</sup>. Os resultados das medidas mostraram que  $\Delta C_p$  da solução de proteína é muito grande isto é, para a transferência do estado sólido seco para a solução aquosa. Para as três proteínas estudadas  $\Delta C_p$  foi 0,35 J/K.g de proteína. Foi feita uma consideração para compreender o valor alto de  $\Delta C_p$  em termos da solvatação dos vários grupos na estrutura da proteína, usando dados de compostos modelos. A partir dos dados de  $\bar{C}_p^\circ$  para compostos modelos foi feita uma estimativa do  $\bar{C}_p^\circ$  total da proteína considerando a aditividade dos grupos componentes da proteína ou seja:

$$\bar{C}_p^\circ = C_p (\text{cadeia peptídica}) + \bar{C}_{p_2}^\circ (\text{grupos polares}) + \bar{C}_{p_2}^\circ (\text{grupos não polares}) + \Delta C_p^\circ (\text{ionização})$$

A timina (5-Metil-2,4-dioxipirimidina), uma das principais bases pirimídicas do DNA foi estudada calorimetricamente, com o objetivo de se obter mais informações sobre as interações entre a água e DNA<sup>55</sup>.

Os calores de solução de timina em água e etanol foram determinados em várias temperaturas e os dados foram combinados com os dados de solubilidade, para se obter as propriedades termodinâmicas básicas de transferência entre água e álcool. O valor de  $\Delta C_p$  para a transferência foi muito pequeno de onde se concluiu que a interação hidrofóbica não desempenha um papel importante na estabilidade dos ácidos nucleicos. Embora  $\Delta C_p \approx 0$  a capacidade calorífica

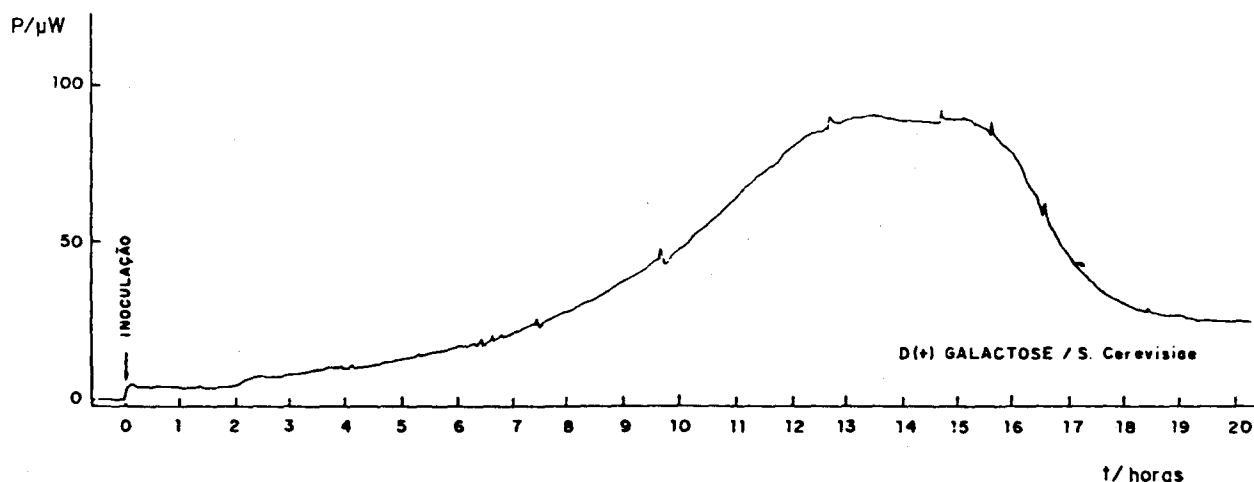


Figura 3 – Curva p-t do crescimento anaeróbico de *Sacharomyces cerevisiae* em solução de D (+) galactose.

Tabela 3. Valores de  $\Delta H_{trs}$  ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) para a transferência de solutos da água para células, 1-octanol; heptano e propileno carbonato.

Soluto	Células	1-octanol <sup>a</sup>	heptano <sup>b</sup>	Propileno carbonato <sup>b</sup>
m-metoxifenol	-0,22	-8,03 ± 0,19	20,9 ± 0,6	23,2 ± 0,3
m-etoxifenol	-1,1	-6,95 ± 0,15	19,3 ± 0,9	23,4 ± 0,4
m-propoxifenol	-2,02	-6,96 ± 0,14	16,0 ± 0,5	23,9 ± 0,4
m-butoxifenol	-4,06	-	13,9 ± 0,5	23,4 ± 0,4
m-pentoxifenol	-5,14	-	12,0 ± 0,4	23,2 ± 0,3

<sup>a</sup> Dados da referência (58). <sup>b</sup> Dados da referência (4).

da solução em cada solvente foi grande. Isto sugeriu que esta capacidade calorífica alta deve estar associada às pontes de hidrogênio entre soluto e solvente, que dependem da temperatura.

Sistemas proteínas-surfatantes podem por exemplo, servir como modelo para se estudar interações das proteínas da membrana com lipídios. Uma molécula de proteína pode se ligar a um número muito grande de moléculas de surfatantes. Usando um microcalorímetro Beckman com cela de reação tipo batelada, Jones *et al.*,<sup>56</sup> estudaram a interação de SDS (dodecil sulfato de sódio) à RNase. Juntamente com as medidas calorimétricas foi determinado por diálise o número de moléculas  $\bar{v}$  de SDS ligadas por mol de proteína, numa ampla faixa de concentração de surfatante, onde  $\bar{v}$  é o valor médio do número de moles do ligante SDS por mol de proteína:

$$\bar{v} = \frac{[\text{SDS}]_{\text{TOTAL}} - [\text{SDS}]_{\text{LIVRE}}}{[\text{RNase}]}$$

Os termogramas deste trabalho sugerem claramente que a interação do SDS com RNase envolve dois processos. Em valores baixos de  $\bar{v}$  ocorre um processo exotérmico de interação rápida. Em valores intermediários de  $\bar{v}$  o processo de interação exotérmico inicial é seguido por um processo endotérmico mais lento, o qual pode ser atribuído ao desembaraçamento da cadeia. Em valores altos de  $\bar{v}$  ambos os processos de desembaraçamento e interação ocorrem mais rapidamente de maneira que o processo endotérmico fica encoberto no processo exotérmico registrado. Os termogramas ou curvas p-t não refletem diretamente a velocidade do processo, que está ocorrendo por causa da constante de tempo finita do calorímetro.

Recentemente, Beezer *et al.*,<sup>6</sup> estudaram calorimetricamente o processo de transferência de fase de compostos bactericidas da fase aquosa para as células de microorganismos. A entalpia de interação de uma série de m-alcoixifenóis com *Escherichia coli* suspensa numa solução isotônica foi medida e os dados estão contidos na Tabela 3. Estes dados foram obtidos de curvas p-t como a representada na figura 4 e em todos os termogramas ocorre um processo endotérmico rápido, representando a transferência do soluto da solução aquosa para as células ( $\Delta H_{trs}$ ) e em seguida um processo exotérmico lento que é a consequência biológica do próprio processo de transferência. Os valores obtidos

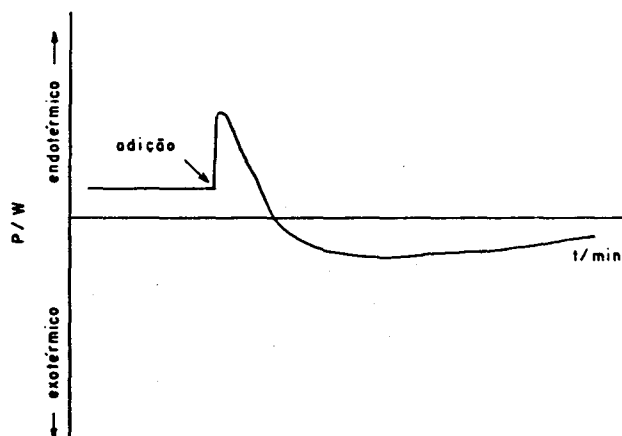


Figura 4 - Curva p-t representativa para a adição do soluto líquido puro na suspensão de *Escherichia coli*.

foram comparados com os valores de  $\Delta H_{trs}$  encontrados para a transferência em solventes modelos n-octanol, n-heptano e propileno carbonato que são amplamente usados para mimificar a fase lipídica. O estudo calorimétrico sistemático da transferência de fase de uma série homóloga de álcoois da fase aquosa para a fase micelar<sup>57</sup>, assim como para células de microorganismos, tem fornecido importantes informações sobre o efeito hidrofóbico e contribuído para o critério de escolha de solventes modelos.

## CONCLUSÕES

O uso de microcalorímetros em experimentos "não termodinâmicos", em bioquímica e biologia é ainda pouco explorado, mas a calorimetria, em adição à sua importância no trabalho termodinâmico, tem se firmado recentemente, como uma técnica analítica muito promissora, com suas mais interessantes aplicações em sistemas de natureza biológica.

Nestes últimos anos tem havido um número crescente de grupos de pesquisa, que iniciaram investigações calorimétricas em organismos vivos, tais como bactérias, fungos, algas e células do sangue humano. Entretanto nota-se que nestes estudos a ênfase é o uso de calorímetros como ferramentas analíticas.

Num senso estritamente analítico, provavelmente o maior potencial de uso das técnicas microcalorimétricas está na área de química clínica; entretanto, percebe-se que o uso nesta área irá aumentar quando aparecerem microcalorímetros automáticos de operação simples e de tempo de reciclagem mais rápido. De fato, um paralelo pode ser traçado entre o desenvolvimento da microcalorimetria biológica de hoje e a espectrofotometria de cerca de 40 anos atrás. A introdução do espectrofotômetro Cary-Beckman revolucionou a medida da absorção da luz e se tornou uma das melhores técnicas para a identificação e determinação da quantidade de compostos biologicamente importantes. Este estágio não foi atingido da noite para o dia e foi o resultado do trabalho de muitos laboratórios, que fizeram muitas análises e desenvolveram os procedimentos para determinar as quantidades.

Por analogia, espera-se que no futuro, a microcalorimetria se torne quase de uso rotineiro em muitas e variadas aplicações analíticas.

#### AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao British Council. Ao Cláudio Antônio Tonegutti pela ajuda nas revisões.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Beezer, A.E.; "Biological Microcalorimetry", Academic Press Landen (1980).
- <sup>2</sup> James, A.M.; "Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems", Wright, Bristol (1987).
- <sup>3</sup> Spink, C.; Wadsö, I.; "Methods of Biochemical Analysis", vol. 23, Glick, D., (ed.) Wiley Interscience, New York (1976).
- <sup>4</sup> Beezer, A.E.; Volpe, P.L.O.; Hunter, W.H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, (1986) 82, 2863.
- <sup>5</sup> Grime, J.K.; "Analytical Solution Calorimetry" John Wiley, N. York (1985).
- <sup>6</sup> Beezer, A.E.; Volpe, P.L.O.; Miles, R.J.; Hunter, W.H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* (1986) 82, 2929.
- <sup>7</sup> Suurkuusk, K.; Wadsö, I.; *Chem. Scripta* (1982) 20, 155.
- Poe, M.; Gutfreund, H.; Estabrook, R.W.; *Archives of Biochem. Biophys.* (1976) 122, 204.
- <sup>8</sup> Poe, M.; Gutfreund, J.; Estabrook, R.W.; *Archives of Biochem. Biophys.* (1976) 122, 204.
- <sup>9</sup> Poe, M.; *25th Annu. Calorimetry Conf.*, Gaithersburg, Md., (1970).
- <sup>10</sup> CRC – Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3th ed., Vol. I, Physical and Chemical Data, Gerald D. Fasman (Ed.), CRC Press Inc., USA (1976).
- <sup>11</sup> Lehninger, A.L.; "Short Course in Biochemistry", Worth Publishers Inc, N. York (1973).
- <sup>12</sup> Kenneth, B.; *Biochem J.* (1974) 143, 365.
- <sup>13</sup> Stull, D.R.; Westrum, E.G.; Sinke, G.C.; "The Chemical Thermodynamic of Organic Compounds", John Wiley and Sons, New York (1969).
- <sup>14</sup> Kurz, J.L.; *J. Am. Chem. Soc.* (1967) 89, 3524.
- <sup>15</sup> Ragaini, V.; Cavegnaghi, C.; *Chim. Ind. (Milan)* (1969) 51, 370.
- <sup>16</sup> Beare, W.G.; Mc Vicar, G.A.; Ferguson, J.B.; *J. Phys. Chem.*, (1930) 34, 1310.
- <sup>17</sup> Hartley, G.S.; *Trans. Faraday Soc.* (1931) 27, 10.
- <sup>18</sup> Arnett, E.M.; Burke, J.J.; Carter, J.V.; Douthy, C.F.; *J. Am. Chem. Soc.* (1972) 94, 7837.
- <sup>19</sup> Rossini, F.D.; Wagman, D.D.; Evans, W.H.; Levine, S.; Jaffe, I. "Selected Values of Chemical Thermodynamic Properties", National Bureau of Standards – Circular Nº 500, Washington (1952).
- <sup>20</sup> Aveyard, R.; Lawrence, A.S.C.; *Trans Faraday Soc.* (1964) 60, 2265.
- <sup>21</sup> Butler, J.A.V.; Ramchandani, C.N.; Thomson, D.W.; *J. Chem. Soc., London* (1935), 280.
- <sup>22</sup> Goldberg, R.N.; Prosen, E.J.; Staples, B.R.; Boyd, R.N.; Armstrong, G.T.; National Bureau of Standards, Report NBSIR 73-178, Washington (D.C.) (1973).
- <sup>23</sup> Volpe, P.L.O.; *Quím. Nova* (1987) 10, 122.
- <sup>24</sup> Wadsö, I.; "Calorimetry, Thermometry and Thermal Analysis". The Society of Calorimetry and Thermal Analysis, Kagaku Gijitsu-sha, Tokyo (1973).
- <sup>25</sup> Smith, E.B.; Carr, P.W.; *Anal. Chem.*, (1973) 45, 1688.
- <sup>26</sup> Carr, P.W.; Smith, E.B.; Betso, S.R.; Callicott, R.H.; "Analytical Calorimetry", Vol. 3; Porter, R.S. and Johnson, J.R. (Eds.), Plenum Press, New York, (1974) p. 457.
- <sup>27</sup> Monk, P.; Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.*, (1969) 23, 29.
- <sup>28</sup> Mc Glothlin, C.D.; Jordan, J.; *Chim. Chem.* (1975) 21, 741.
- <sup>29</sup> Goldberg, R.N.; Prosen, E.J.; Staples, B.R.; Boyd, R.N.; Armstrong, G.T.; *Anal. Biochem.* (1975) 64, 68.
- <sup>30</sup> Bowers, L.D.; Carr, P.W.; *Chim. Chem.* (1976) 22, 1427.
- <sup>31</sup> Schmidt, H.L.; Krisan, G.; Grenner, G.; *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 429, 283.
- <sup>32</sup> Johansson, Å. "Protides of the Biological Fluids", Vol. 20, H. Peters (Ed.) Academic Press, Oxford (1979).
- <sup>33</sup> Beezer, A.E.; Steenson, T.I.; Tyrrell, H.J.V.; *Talanta* (1974) 21, 467.
- <sup>34</sup> Rehak, N.N.; Janes, G.; Young, D.S.; *Clin. Chem.* (1977) 23, 195.
- <sup>35</sup> Nelson, D.P.; Kiesow, L.A.; *Anal. Biochem.* (1972) 49, 474.
- <sup>36</sup> Mc Guinness, E.T.; Brown, H.D.; Chattopadhyay, S.K.; Chen, F.; *Biochim. Biophys. Acta* (1978) 530, 247.
- <sup>37</sup> Pennington, S.N.; Brown, H.D.; Patel, A.B.; Chattopadhyay, S.K.; Berger, R.L.; *Anal. Lett.* (1969) 2, 247.
- <sup>38</sup> Yourtee, D.M.; Brown, H.D.; Chattopadhyay, S.K.; Phillips, D.; Evans, W.J.; *Anal. Lett.* (1975) 8, 41.
- <sup>39</sup> Monk, P.; Wadsö, I.; *Acta. Chem. Scand.* (1969) 23, 29.
- <sup>40</sup> Konickova, J.; Wadsö, I.; *Acta. Chem. Scand.* (1971) 25, 2360.



- <sup>41</sup> Wilson, R.; Huffman, L.; Brown, H.; Pennington, S.; *Mikrochim. Acta.* (1969) 1204.
- <sup>42</sup> Prat, H.; *Rev. Can. Biol.* (1953) 12, 19.
- <sup>43</sup> Beezer, A.E.; Newell, R.D.; Tyrrell, H.J.V.; *Anal. Chem.*, (1977) 49, 34.
- <sup>44</sup> Beezer, A.E.; Chowdry, B.Z.; Newell, R.D.; Tyrrell, H.J.V.; *Anal. Chem.* (1977) 49, 1781.
- <sup>45</sup> Boling, E.A.; Blanchard, G.C.; Russel, W.J.; *Nature* (1973) 241, 472.
- <sup>46</sup> Beezer, A.E.; Volpe, P.L.O.; Gooch, C.A.; Hunter, W.H.; Miles, R.J.; *Int. J. Pharm.* (1986) 29, 237.
- <sup>47</sup> Mortensen, U.; Norén, B.; Wadsö, I.; *Bull. Ecol. Res. Commun. (Stochl.)* (1973) 17, 189.
- <sup>48</sup> Cliffe, A.J.; McKinnon, C.H.; Berridge, N.J.; *J. Soc. Dairy Technol.* (1973) 26, 209.
- <sup>49</sup> Beezer, A.E.; Bettelheim, K.A.; Newell, R.D.; Stevens, J.; *Sci. Tools* (1974) 21, 13.
- <sup>50</sup> Delin, S.; Monk, P.; Wadsö, I.; *Sci. Tools* (1969) 16, 22.
- <sup>51</sup> Monk, P.; Wadsö, I.; *J. Appl. Microbiol.* (1975) 38, 71.
- <sup>52</sup> Volpe, P.L.O.; Trabalho desenvolvido durante o programa de Cooperação Internacional CNPq – British Council – em elaboração.
- <sup>53</sup> Suurkuusk, J.; *Acta. Chem. Scand.* (1974) B28, 409.
- <sup>54</sup> Suurkuusk, J.; Wadsö, I.; *J. Chem. Thermodyn.* (1974) 6, 667.
- <sup>55</sup> Alvarez, J.; Biltonen, R.; *Biopolymers* (1973) 12, 1815.
- <sup>56</sup> Jones, M.N.; Skinner, H.A.; Tipping, E.; Wilkinson, A.; *Biochem. J.* (1973) 135, 231.
- <sup>57</sup> Eloi, A.S.F.; Volpe, P.L.O.; trabalho em andamento.
- <sup>58</sup> Beezer, A.E.; Hunter, W.H.; Storey, D.E.; *J. Pharm. Pharmacol.* (1980) 32, 815.

## REVISÃO

### TERMINOLOGIA EM CROMATOGRAFIA. PARTE I. VOCABULÁRIO PARA CROMATOGRAFIA.

Carol H. Collins, Francisco Radler de Aquino Neto e  
José Roberto Pereira da Silva

*Instituto de Química da UNICAMP; C. Postal 6154; 13081 – Campinas (SP).*  
*Instituto de Química da UFRJ; C. Postal 1573; 21910 – Rio de Janeiro (RJ).*  
*Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Cia. de Cigarros Souza Cruz; 21050 – Rio de Janeiro (RJ).*

Recebido em 1/6/88

#### ABSTRACT

Corresponding chromatographic terms in English and Portuguese are presented, along with various definitions and explanations, to help normalize the words and expressions used in the Portuguese chromatographic literature.

#### RESUMO

Termos cromatográficos em inglês e português, bem como várias definições e esclarecimentos, são apresentados para facilitar a normalização de um vocabulário a ser usado na literatura cromatográfica na língua portuguesa.

#### 1. INTRODUÇÃO

A história da normalização de termos técnicos da Química em português está pontuada de perfeccionismos lingüísticos e anglicismos desnecessários.

Essa dicotomia tem impedido a aceitação de nomenclaturas unificadas para os diversos setores dessa Ciência.

A presente proposta, na área de Cromatografia, procurou usar grandes doses de bom senso de modo a conciliar as duas correntes antagônicas numa nomenclatura de compromisso. Compromisso com a língua portuguesa em sua construção básica e compromisso com uma linguagem sucinta, quase telegráfica, tirada de traduções literais do inglês. Justifica-se esse segundo compromisso pela necessidade de uma linguagem direta e simples para a comunicação científica, sendo que, na maioria dos casos, os termos científicos só tem significado após acurada definição.

Como se desprenderá adiante, não há lugar para preocupações desmesuradas com o significado coloquial de palavras, numa área de atuação que se abriga sob o título "Cromatografia", que como se sabe não é a "escrita em cores" (para uma apreciação histórica veja Morhy<sup>1</sup> e Cremer<sup>2</sup>). Quem, lendo essa palavra, poderia imaginar o processo a que se refere? Apenas uma rigorosa definição científica permite que se compreenda a sua amplitude e significado.

Sejamos, pois, benevolentes com termos dela derivados, os quais, igualmente bem definidos, possam ser emprega-